

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

TADEU ÉRITON CALIMAN ZANARDO

**INFLUÊNCIA DA HIPERCOLESTEROLEMIA SOBRE CÉLULAS-
TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA DE
CAMUNDONGOS APOE *KNOCKOUT***

VITÓRIA
2016

TADEU ÉRITON CALIMAN ZANARDO

**INFLUÊNCIA DA HIPERCOLESTEROLEMIA SOBRE CÉLULAS-
TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA DE
CAMUNDONGOS APOE *KNOCKOUT***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira

Coorientadora: Profa. Dra. Marcella Leite Porto

VITÓRIA
2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

"Influência da Hipercolesterolemia Sobre Células-tronco Mesenquimais da Medula Óssea de Camundongos apoE *knockout*"

Tadeu Ériton Caliman Zanardo

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado por:

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira (UFES)

Orientador

Profª. Drª. Marcella Leite Porto (UFES)

Coorientadora

Profª. Drª. Flavia Imbroisi Valle Errera (UFES)

Membro Interno

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba (UFJF)

Membro Externo

Vitória-ES, 04 de Abril de 2016.

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Z27i Zanardo, Tadeu Ériton Caliman, 1991-
 Influência da Hipercolesterolemia Sobre Células-tronco
 Mesenquimais da Medula óssea de Camundongos apoE
 Knockout / Tadeu Ériton Caliman Zanardo – 2016.
 83f. : il.

Orientador: Breno Valentim Nogueira.
Coorientador: Marcella Leite Porto.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Hipercolesterolemia. 2. Células-Tronco. 3. Espécies
Reativas de Oxigênio. 4. Senescência. 5. Apoptose. I. Nogueira,
Breno Valentim. II. Porto, Marcella Leite. III. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde.
IV. Título.

CDU: 61

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pois sem sua misericórdia e compaixão seria impossível a realização deste sonho. Além disso, guiou-me durante toda a minha caminhada e nunca permitiu que o desânimo tomasse conta de mim, mesmo em momentos que pareciam não haver saída.

Agradeço a minha família, os quais são a base de tudo. Vocês são os melhores exemplos de vida e sempre me espelho em vocês. Obrigado por tudo!

Agradeço também ao meu orientador, professor Breno e ao professor Marco. Vocês abriram a porta do laboratório e acreditaram em mim desde o começo. Vocês são exemplos de dedicação a pesquisa! Do mesmo modo, meu agradecimento a professora Silvana Meyrelles, pois foi de grande importância para a realização deste trabalho.

Marcella Porto, seria necessário escrever uma página agradecendo. Muito obrigado por cada orientação e ajuda. Você não poupou esforços para que tudo desse certo! Do mesmo modo, Bianca Rodrigues, sempre disponível me ajudando com a cultura, agradeço muito pela ajuda e dedicação!

Afrânio, você esteve comigo esses dois anos, você é um amigo de verdade que espero levar para toda a vida. Obrigado irmão! Jairo, você me ajudou demais, obrigado pela amizade e por tudo!

Do mesmo modo, Wanderson, Flavia, Débora, Rayssa, Danilo, Suely, Hélio, Gabriela, Ingrid, Barbara, Brunelli, Isabella, Vinícius, Aricia, Andressa, Isadora e Rafaela. Obrigado pelas conversas, risadas, brincadeiras. Enfim, obrigado pela amizade de cada um!

RESUMO

Devido suas características e propriedades, células-tronco mesenquimais vêm sendo frequentemente utilizadas no tratamento de doenças que acometem grande parte da população e que acarretam custo elevado para o sistema de saúde. No entanto, até o momento, pouco se sabe sobre a funcionalidade de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de indivíduos doentes, para utilização em terapia celular. Desse modo, no presente estudo, avaliamos a influência da hipercolesterolemia sobre células-tronco mesenquimais derivadas da medula-óssea de camundongos apoE *knockout*. Foram avaliados a colesterolemia e o estresse oxidativo plasmático, bem como a produção de espécies reativas de oxigênio, a porcentagem de apoptose e de senescência e possíveis alterações morfológicas em células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de camundongos apoE^{-/-} (hipercolesterolêmicos) e camundongos C57 (normocolesterolêmicos), com 2 meses de idade. Observou-se que a hipercolesterolemia, a qual se desenvolve espontaneamente em camundongos apoE^{-/-}, promove aumento no estresse oxidativo plasmático (apoE^{-/-}: 29,83 ± 3,58 µmol/mg vs. C57: 11,20 ± 1,89 µmol/mg, p< 0,001, teste *t* de Student), bem como aumento na produção de O₂-• (1,5 vezes, p< 0,01, teste *t* de Student), H₂O₂ (1,4 vezes, p< 0,01, teste *t* de Student) e NO (1,3 vezes, p<0,05, teste *t* de Student) em células-tronco mesenquimais da medula óssea. Consequentemente, houve um aumento na porcentagem de células senescentes (apoE^{-/-}: 4,1 ± 0,53% vs. C57: 0,7 ± 0,12%, p< 0,001, teste *t* de Student) e apoptóticas (apoE^{-/-}: 7,48 ± 0,32% vs. C57: 2,31 ± 0,15%, p< 0,0001, teste *t* de Student), bem como aumento no tamanho (apoE^{-/-}: 30529 ± 664,5 a.u. vs. C57: 27429 ± 589,8 a.u. p< 0,01, teste *t* de Student), área celular (apoE^{-/-}: 6142 ± 603,6 µm² vs. C57: 3682 ± 267,7 µm², p<0,001, teste *t* de Student) e área nuclear (apoE^{-/-}: 127,6 ± 8,31 µm² vs. C57: 106 ± 4,69 µm², p<0,05, teste *t* de Student), além de alterações morfológicas em cultura e ao nível mitocondrial nessas células. Desse modo, a hipercolesterolemia influencia a funcionalidade de células-tronco mesenquimais da medula óssea, podendo afetar a eficácia no uso dessas células para tratamento, cura e ou prevenção de doenças.

Palavras-chave: Hipercolesterolemia. Células-tronco mesenquimais. Espécies reativas de oxigênio. Senescência. Apoptose.

ABSTRACT

Due to its characteristics and properties, mesenchymal stem cells have often been used in the treatment of diseases that affect a large part of the population and which entail high costs for the health system. However, to date, little is known about the functionality of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of diseased individuals, for use in cell therapy. Thus, in the present study, we evaluated the influence of hypercholesterolemia on mesenchymal stem cells derived from bone marrow of apoE *knockout* mice. We evaluated the blood cholesterol and plasma oxidative stress and the production of reactive oxygen species, the percentage of apoptosis and senescence and possible morphological changes in mesenchymal stem cells derived from bone marrow of apoE^{-/-} mice (hypercholesterolemic) and C57 mice (normocholesterolemic), at 2 months of age. It was observed that hypercholesterolemia, which develop spontaneously in apoE^{-/-} mice promotes increased plasma oxidative stress (apoE^{-/-}: 29,83 ± 3,58 µmol/mg vs. C57: 11,20 ± 1,89 µmol/mg, p < 0,001, Student *t* test), as well as increased production of O₂•⁻ (1.5 fold, p < 0.01, Student *t* test), H₂O₂ (1.4 fold, p < 0.01, Student *t* test) and NO (1.3-fold, p < 0.05, Student *t* test) in mesenchymal stem cells from bone marrow. Consequently, there was an increase in the percentage of senescent (apoE^{-/-}: 4,1 ± 0,53% vs. C57: 0,7 ± 0,12%, p < 0,001, Student *t* test) and apoptotic cells (apoE^{-/-}: 7,48 ± 0,32% vs. C57: 2,31 ± 0,15%, p < 0,0001, Student *t* test) and increase in size (apoE^{-/-}: 30529 ± 664,5 a.u. vs. C57: 27429 ± 589,8 a.u. p < 0,01, Student *t* test), cell area (apoE^{-/-}: 6142 ± 603,6 µm² vs. C57: 3682 ± 267,7 µm², p < 0,001, Student *t* test) and nuclear area (apoE^{-/-}: 127,6 ± 8,31 µm² vs. C57: 106 ± 4,69 µm², p < 0,05, Student *t* test), in addition to morphological changes in culture and these cells at the mitochondrial level. Thus, hypercholesterolemia affects the functionality of mesenchymal stem cells from bone marrow, which may affect the effectiveness of using these cells to treat, cure or prevention of diseases.

Keywords: Hypercholesterolemia. Mesenchymal stem cells. Oxygen-reactive species. Senescence. Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Dados referentes à mortalidade proporcional por grupo de causas, Espírito Santo, 2001, 2012 e 2013	13
Figura 2 - Estágios no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas	15
Figura 3 - Níveis plasmáticos de Colesterol Total, HDL Colesterol e Triglicerídes em camundongos ApoE <i>knockout</i> heterozigotos e homozigotos comparados com animais normais	17
Figura 4 - Principais geradores celulares de ROS	19
Figura 5 - Representação esquemática da geração de ROS	20
Figura 6 - Enzimas antioxidantes e as reações que elas catalizam	21
Figura 7 - Capacidade de diferenciação das CTMs de medula óssea	25
Figura 8 - Porcentagens de ensaios clínicos envolvendo CTMs em doenças	28
Figura 9 - Mecanismos de ativação da senescência celular	31
Figura 10 - Vias que conduzem à morte celular	34
Figura 10 - Análise morfométrica celular e nuclear das CTMs em cultura	44
Figura 12 - Concentração plasmática dos produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) em camundongos apoE ^{-/-} e C57	48
Figura 13 - Caracterização imunofenotípica das CTMs	49
Figura 14 - Gráficos de tamanho e complexidade interna de CTMs de camundongos apoE ^{-/-} e C57	50
Figura 15 - Efeitos da hipercolesterolemia sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em CTMs de camundongos apoE ^{-/-} e C57	51
Figura 16 - Efeitos da hipercolesterolemia sobre a porcentagem de apoptose celular em amostras de CTMs de animais apoE ^{-/-} e C57	52
Figura 17 - Influência da hipercolesterolemia sobre a senescência em CTMs	53
Figura 18 - Morfologia das CTMs derivadas da medula óssea de camundongos apoE ^{-/-} e C57	54
Figura 19 - Área celular e nuclear das CTMs de camundongos apoE ^{-/-} e C57	55
Figura 20 - Micrografias eletrônicas de transmissão de CTMs de camundongos apoE ^{-/-} e C57	57

Figura 21 - Micrografias eletrônicas de transmissão de CTMs de camundongos apoE ^{-/-} e C57	58
Figura 22 - Micrografias eletrônicas de transmissão de CTMs de camundongos apoE ^{-/-} e C57	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de colesterol total, LDL e triglicérides em camundongos C 57 e apoE ^{-/-}	47
--	----

LISTA DE SIGLAS

DCVs	Doenças Cardiovasculares
AVC	Acidente vascular cerebral
CID-10	Código Internacional de doenças
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
ROS	Espécies reativas de oxigênio
LDL-ox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
SMCs	Células do músculo liso
apoE	Apolipoproteína E
KD	KiloDalton
apoE ^{-/-}	Camundongo <i>knockout</i> para apolipoproteína E
C57	Camundongo selvagem
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
HDL	Lipoproteína de alta densidade
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido (O ₂ ^{•-})
NO	Óxido nítrico
•OH	Radical hidroxila
ClO ⁻	Hipoclorito
ONOO ⁻	Peroxinitrito
O ₃	Ozônio
¹ O ₂	Oxigênio molecular
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ER	Retículo endoplasmático
LCFA	Ácidos graxos de cadeia longa
SOD	Superóxido dismutase
CAT	Catalase
GPX	Glutathione peroxidase
GRX	Glutathione reductase (GRX)
CTEs	Células-tronco embrionárias
CTAs	Células-tronco adultas

CSCs	Células-tronco espermatogônias
CTMs	Células-tronco mesenquimais
ISCT	Sociedade Internacional de Terapia Celular
SFB	Soro fetal bovino
DDR	Respostas de dano ao DNA
ATP	Trifosfato de adenosina
AOPP	Produtos avançados de oxidação proteica
PBS	Tampão salina fosfato
DHE	Dihidroetídeo
DCFH-DA	2',7' -diacetato de diclorofluoresceína
DAF	4,5- diaminofluoresceína-2/diacetato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> ,
MFI	Intensidade de fluorescência média
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo
CT	Colesterol total
EPM	Erro Padrão da Média
β -gal	β -galactosidase
a.u.	Unidades arbitrárias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Aterosclerose	12
1.1.1 Doenças Cardiovasculares e Aterosclerose	12
1.1.2 O Modelo apoE Knockout de Aterosclerose	16
1.2 Estresse Oxidativo	18
1.3 Introdução as Células-Tronco	23
1.3.1 Células-Tronco Mesenquimais	25
1.4 Efeitos do Estresse Oxidativo Sobre Células-Tronco Mesenquimais	28
1.4.1 Senescência Celular	29
1.4.2 Apoptose	32
2 JUSTIFICATIVA	35
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo Geral	36
3.2 Objetivos Específicos	36
4 METODOLOGIA	37
4.1 Animais Experimentais	37
4.2 Dosagem Plasmática de Colesterol Total, Colesterol LDL e Triglicérides	37
4.3 Análise de Produtos Avançados de Oxidação Proteica – AOPP	38
4.4 Isolamento de Células Mononucleares da Medula-óssea e Separação das Células-tronco Mesenquimais	38
4.5 Análise das Células-tronco Mesenquimais por Citometria de Fluxo	39
4.5.1 Caracterização Fenotípica	39
4.5.2 Determinação dos Níveis Citoplasmáticos de Espécies Reativas de Oxigênio	40
4.5.3 Determinação da Apoptose Celular	41
4.6 Determinação da Senescência Celular Associada a β -Galactosidase	42
4.7 Caracterização Morfológica das Células-tronco Mesenquimais	43
4.7.1 Características morfológicas das Células-tronco Mesenquimais em Cultura	43
4.7.2 Análise Morfométrica Celular e Nuclear	43

4.7.3 Análise Ultraestrutural	45
4.8 Análise Estatística	46
5 RESULTADOS	47
5.1 Níveis Plasmáticos de Colesterol Total, Colesterol LDL e Triglicérides .	47
5.2 Níveis de Estresse Oxidativo Plasmático	48
5.3 Análise das Células-tronco Mesenquimais por Citometria de Fluxo	49
5.3.1 Imunofenotipagem	49
5.3.2 Tamanho Celular e Complexidade Interna	50
5.3.3 Efeitos da Hipercolesterolemia sobre os Níveis Citoplasmáticos de Espécies Reativas de Oxigênio em Células-tronco Mesenquimais	51
5.3.4 Efeitos da Hipercolesterolemia Sobre a Apoptose em Células-tronco Mesenquimais	52
5.4 Efeitos da Hipercolesterolemia Sobre a Senescência em Células-tronco Mesenquimais	53
5.5 Efeitos da Hipercolesterolemia sobre a Morfologia das Células-tronco Mesenquimais	54
5.5.1 Morfologia em Cultura	54
5.5.2 Área Celular e Nuclear	55
5.5.3 Ultraestrutura	56
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÃO	71
8 REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aterosclerose

1.1.1 *Doenças Cardiovasculares e Aterosclerose*

As doenças cardiovasculares (DCVs) são um grupo de doenças do coração e dos vasos sanguíneos, as quais representam a principal causa de morte no mundo. Dados de 2012, mostram que 17,5 milhões de pessoas morreram de DCVs, representando cerca de 31% de todas as mortes globais. Dessas mortes, destacam-se a doença cardíaca coronariana com 7,4 milhões e o acidente vascular cerebral (AVC) com 6,7 milhões de óbitos (OMS, 2015).

No Brasil, dados do Ministério da Saúde (2011), mostram que as DCVs são responsáveis por 29,4% de todas as mortes registradas. Isso significa que mais de 308 mil pessoas faleceram principalmente de infarto e AVC, colocando o país entre os 10 países com maior índice de mortes por DCVs.

No estado do Espírito Santo, uma análise dos óbitos listados por capítulo do Código Internacional de doenças (CID-10), mostra que as principais causas de mortes são oriundas de doenças no aparelho circulatório, as quais incluem as DCVs, representando um total de 29,5%. Além disso, se comparados os dados referentes ao ano de 2001 à 2013, observamos um aumento de 2,9 % em causas de óbitos referentes ao aparelho circulatório (Figura 1) (INSTITUTO JONES DOS SANTOS NEVES, 2013).

A principal característica das DCVs é a presença da aterosclerose. A aterosclerose pode ser definida como uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibres (ROSS, 1993).

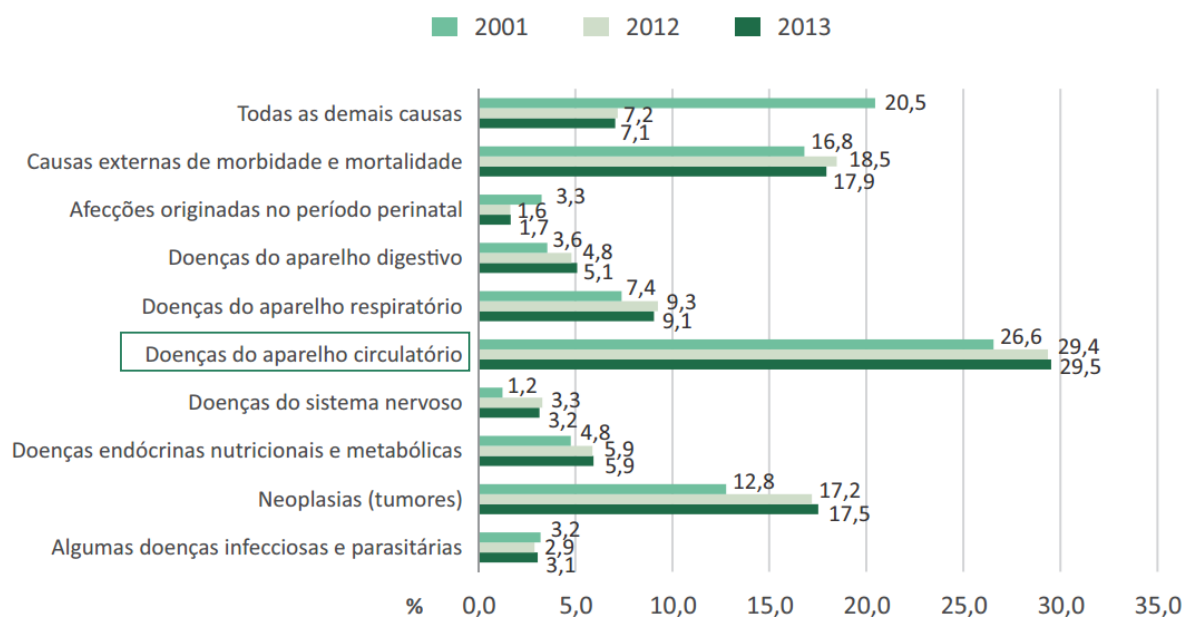


Figura 1: Dados referentes a mortalidade proporcional por grupo de causas, Espírito Santo, 2001, 2012 e 2013. Fonte: (INSTITUTO JONES DOS SANTOS NEVES, 2013).

No estágio inicial do desenvolvimento da placa aterosclerótica, o endotélio da parede arterial está intacto e não há expressão de moléculas de adesão para leucócitos em sua superfície. No entanto, o endotélio quando sujeito a estímulos irritativos, tais como dislipidemia e hipertensão, favorece a adesão leucocitária (LIBBY et al., 2011).

Como consequência da disfunção endotelial, há um aumento da permeabilidade da camada íntima às lipoproteínas plasmáticas, favorecendo a retenção das mesmas no espaço subendotelial. Retidas, as partículas de LDL (Low Density Lipoproteins) sofrem oxidação por espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species- ROS*) produzidas por células endoteliais, macrófagos residentes e células musculares lisas, modificando sua estrutura e causando a exposição de diversos epítomos, tornando-as imunogênicas (XAVIER et al., 2013).

As LDL's oxidadas (LDL-ox) aumentam a permeabilidade a outras LDL e o surgimento de moléculas de adesão leucocitária na superfície endotelial, promovendo a atração de monócitos para a intimidade da parede arterial. Após a

adesão ao endotélio, os monócitos são induzidos por proteínas quimiotáticas a migrarem para o espaço subendotelial e se diferenciarem em macrófagos. Na camada íntima, os macrófagos maduros via receptores *scavengers*, fagocitam LDL-ox sem controle da quantidade recebida e tornam-se células-espumosas (LIBBY et al., 2011; MOORE et al., 2013).

As células espumosas são o principal componente das estrias gordurosas, as quais são lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose. Após ativação, os macrófagos são, em grande parte, responsáveis pela progressão da placa aterosclerótica mediante a secreção de citocinas, que amplificam a inflamação e de enzimas proteolíticas capazes de degradar colágeno e outros componentes teciduais locais (XAVIER et al., 2013). Além do macrófago, o desenvolvimento do processo aterosclerótico envolve a ativação de vários tipos de células (incluindo células endoteliais, células musculares lisas, linfócitos e monócitos) na camada íntima arterial, resultando em uma resposta inflamatória local (CHINETTI-GBAGUIDI et al., 2014).

Posteriormente, o processo inflamatório local criado estimula a migração, proliferação e o recrutamento de células musculares lisas a partir da camada arterial média para a camada arterial íntima. Na camada íntima, as células musculares lisas passam a produzir não só citocinas e fatores de crescimento, mas também moléculas da matriz extracelular, como colágeno e elastina, formando uma capa fibrosa que cobre a placa. Esta capa fibrosa cobre várias células espumosas derivadas de macrófagos, algumas das quais morrem (como por exemplo por apoptose) e acabam liberando os lipídeos que se acumulam no meio extracelular (LIBBY et al., 2011).

A placa aterosclerótica desenvolvida é constituída por elementos celulares, componentes da matriz extracelular, núcleo lipídico e necrótico, formado principalmente por debris de células mortas. As placas plenamente desenvolvidas podem ser de duas formas: estáveis ou instáveis. As placas estáveis possuem predominantemente colágeno, organizado em capa fibrosa espessa, apresentam excasses de células inflamatórias e núcleo lipídico e necrótico de proporções

menores (LIBBY et al., 2011). Em contrapartida, as placas instáveis apresentam atividade inflamatória intensa, especialmente nas suas bordas laterais, com grande atividade proteolítica, núcleo lipídico e necrótico proeminente e capa fibrosa menos espessada. As placas instáveis, podem ainda, expor material lipídico altamente trombogênico, através da ruptura da capa fibrosa, levando a formação de um trombo. A formação do trombo por rompimento da capa fibrosa menos espessada das placas instáveis é um dos principais determinantes das manifestações clínicas da aterosclerose (XAVIER et al., 2013). O processo de formação da placa aterosclerótica pode ser resumido pela Figura 2:

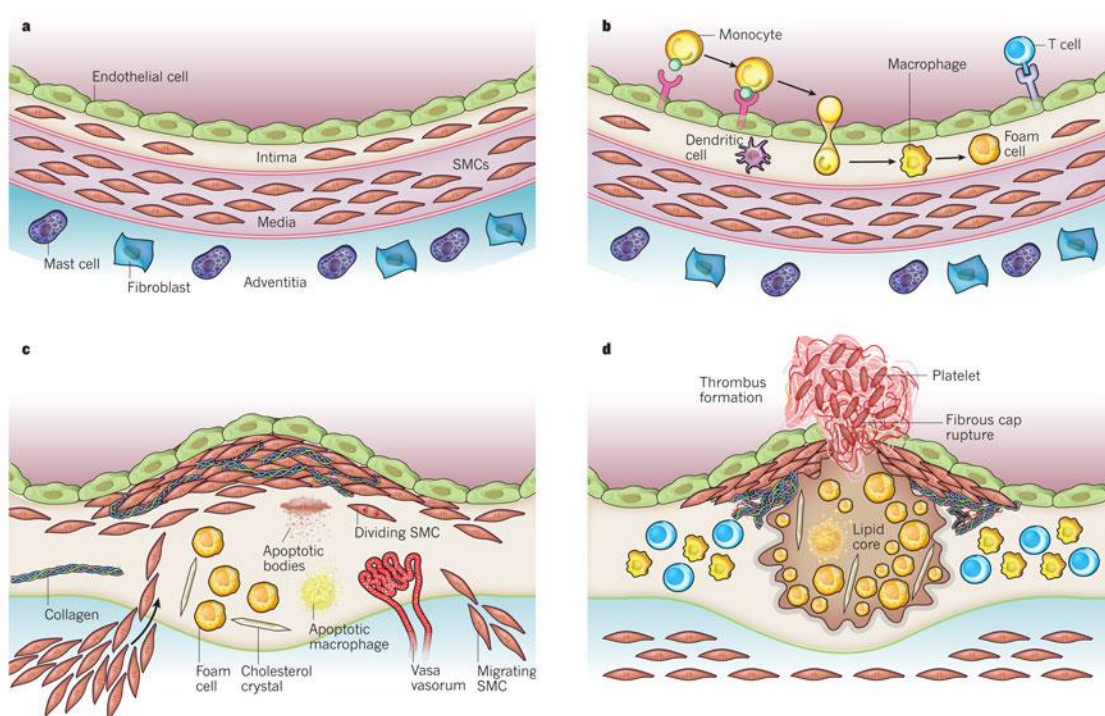


Figura 2: Estágios no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas. (a) Artéria normal com suas três camadas. A camada íntima, é a camada mais interior do vaso sanguíneo, sendo revestida por uma monocamada de células endoteliais e pela lâmina basal. A camada íntima, contém ainda algumas células do músculo liso (SMCs) residentes. A camada logo abaixo da camada íntima é chamada de camada média e contém SMCs incorporadas em uma matriz extracelular complexa; **(b)** Esquema mostrando a adesão leucocitária a monocamada endotelial através do aumento na expressão endotelial de fatores de adesão, como VCAM-1 e P-selectinas, devido a lesões endoteliais causadas por fatores de risco como hipercolesterolemia. Após adesão, os leucócitos migram para a camada íntima, atraídos por fatores de atração e fagocitam principalmente moléculas de LDL-ox se tornando células espumosas (*foam cell*); **(c)** Progressão da lesão envolvendo a migração de SMCs a partir da camada média para a camada íntima, com aumento em sua proliferação. Durante o avanço das lesões, células espumosas e SMCs morrem por apoptose liberando seu conteúdo lipídico na região central da placa; **(d)** Formação do trombo, o qual se desenvolve para o interior do vaso, podendo impedir a passagem sanguínea ou muitas vezes ser levado pela corrente sanguínea até bloquear um vaso de menor calibre. Fonte: (Libby et al., 2011).

1.1.2 O Modelo *apoE Knockout* de Aterosclerose

Dentre as causas para o desenvolvimento da aterosclerose, estão as mutações em genes envolvidos no metabolismo de lipídeos, como por exemplo, no gene que codifica a apolipoproteína E (apoE). A apoE é uma glicoproteína com peso molecular de aproximadamente 34kD, sendo um componente estrutural de todas as lipoproteínas (exceto da LDL), a qual é sintetizada principalmente no fígado, cérebro e outros tecidos tanto em humanos quanto em camundongos. Uma das mais importantes funções da apoE é como ligante de alta afinidade para os receptores de apoE, apolipoproteína B e de remanescentes de quilomícrons, permitindo assim a absorção específica de partículas contendo apoE pelo fígado (ZHANG et al., 1992).

Diante da necessidade de criação de um modelo animal que desenvolvesse aterosclerose semelhantemente ao observado em humanos, foi desenvolvido, inicialmente em 1992, o camundongo *apoE knockout* ($apoE^{-/-}$), simultaneamente por dois grupos distintos (PIEDRAHITA et al., 1992; PLUMP et al., 1992). Durante a produção de camundongos $apoE^{-/-}$, o gene que codifica a apolipoproteína E foi inativado em células-tronco embrionárias de um camundongo saudável. Em seguida essas células foram inseridas em blastômeros de camundongos C57. Os camundongos resultantes são chamados de *apoE knockout*, pois possuem esse gene inativado. (PIEDRAHITA et al., 1992; PLUMP et al., 1992; HANSSON, 2002; JAWIEN, 2012).

Se comparado com outros modelos animais de aterosclerose, os camundongos $apoE^{-/-}$ apresentam uma série de vantagens. Desenvolvem aterosclerose espontaneamente, sem necessidade de uma dieta rica em colesterol (HANSSON, 2002; JAWIEN, 2012). Além disso, são animais pequenos e assim possuem facilidades em sua criação e manutenção em biotérios. Seu tempo de geração é curto, ao redor de 9 semanas, 3 semanas para a gestação e cerca de 6 semanas até a maturidade sexual. (JAWIEN, 2012). Em relação as lesões ateroscleróticas, é observado no modelo $apoE^{-/-}$ que estas situam-se ao longo da macrovasculatura, principalmente na raiz da aorta, arco aórtico, carótida comum, artéria mesentérica

superior e as artérias renais e pulmonares. Estudos sobre a progressão no desenvolvimento das lesões nos animais apoE^{-/-} mostram que os primeiros sinais de lesões aparecem por volta de 6-8 semanas de idade, mostrado pela ligação de monócitos às células endoteliais. Após 8-10 semanas aparecem as lesões contendo células espumosas e células musculares e após 15-20 semanas aparecem as placas fibrosas. Uma dieta do tipo *Western* promove uma aceleração na severidade de lesões ateroscleróticas em todas as fases de seu desenvolvimento (NAKASHIMA et al., 1994; COLEMAN et al., 2006; KOLOVOU et al., 2008; VASQUEZ et al., 2012).

Em relação ao conteúdo plasmático, os animais apoE^{-/-} apresentam a maior parte do colesterol nas frações de lipoproteínas aterogênicas, como nas frações de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e LDL, sendo esse perfil agravado por uma dieta do tipo *Western*. Em uma dieta normal, os camundongos apoE^{-/-} exibem um aumento de 8 vezes em seu colesterol total, 1,7 vezes em triglicérides, 18 vezes em VLDL + IDL e 14 vezes em LDL, quando comparados com camundongos C57. Embora os níveis totais de colesterol plasmático sejam significativamente elevados nos animais mutantes, as lipoproteínas de alta densidade (HDL) são apenas 45% do nível normal (JAWIEN, 2012; VASQUEZ et al., 2012). Os valores de colesterol nos animais apoE^{-/-} estão representados na Figura 3:

Animals	Total cholesterol in mg/dl ± SD (n)	HDL cholesterol in mg/dl ± SD (n)	Triglyceride in mg/dl ± SD (n)
Normal	86 ± 20 (46)	73 ± 28 (34)	73 ± 36 (32)
Heterozygous	88 ± 22 (47)	75 ± 18 (29)	102 ± 40 (41)
Homozygous	434 ± 129 (40)	33 ± 15 (28)	123 ± 51 (42)

Figura 3: Níveis plasmáticos de Colesterol Total, HDL Colesterol e Triglicerídes em camundongos ApoE knockout heterozigotos e homozigotos comparados com animais normais. Fonte: (ZHANG et al., 1992).

Portanto, sem a apolipoproteína E, o modelo apoE^{-/-} apresenta altos níveis de colesterol plasmático, além de desenvolver lesões ateromatosas muito semelhantes ao que é encontrado em humanos, sendo desse modo um dos melhores modelos animais para estudo da aterosclerose.

1.2 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é um fenômeno complexo, o qual pode ser definido com um desequilíbrio entre a produção de ROS e sua degradação, em favor do estado pró-oxidante (SIES, 1997).

As ROS são moléculas pequenas derivadas do metabolismo do oxigênio, as quais incluem radicais livres como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), óxido nítrico (NO), radical hidroxila ($\bullet OH$), hipoclorito ($ClO^{\bullet-}$) e peroxinitrito ($ONOO^{\bullet-}$). Incluem também algumas moléculas que não são radicais livres, mas agentes oxidantes que podem ser facilmente convertidos em radicais, como ozônio (O_3), oxigênio *singlet* (1O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BEDARD; KRAUSE, 2007).

As ROS podem ser geradas a partir de fontes endógenas ou exógenas. As principais fontes exógenas são a poluição do ar e da água, cigarro, álcool, metais pesados, industrialização de alimentos e radiação. As fontes endógenas são resultados de infecções, processos patológicos, ativação imunitária, inflamação e envelhecimento (PHAM-HUY et al., 2008).

Apesar de serem geradas por inúmeras fontes, a produção de ROS de forma endógena é dada principalmente por compartimentos intracelulares, tais como a mitocôndria, retículo endoplasmático, peroxissomos, núcleo, citosol e membranas plasmáticas (BALABAN et al., 2005), sendo a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial o principal local de produção de ROS na maioria das células de mamíferos (BHATTACHARYYA et al., 2014). Outra fonte importante na produção de ROS é através da ação de enzimas como NADPH-oxidase, xantina oxidase, lipoxigenases, mieloperoxidase, óxido nítrico sintetase e ciclo-oxigenase (BHATTACHARYYA et al., 2014). As principais fontes de geração de ROS intracelulares estão esquematizadas na Figura 4:

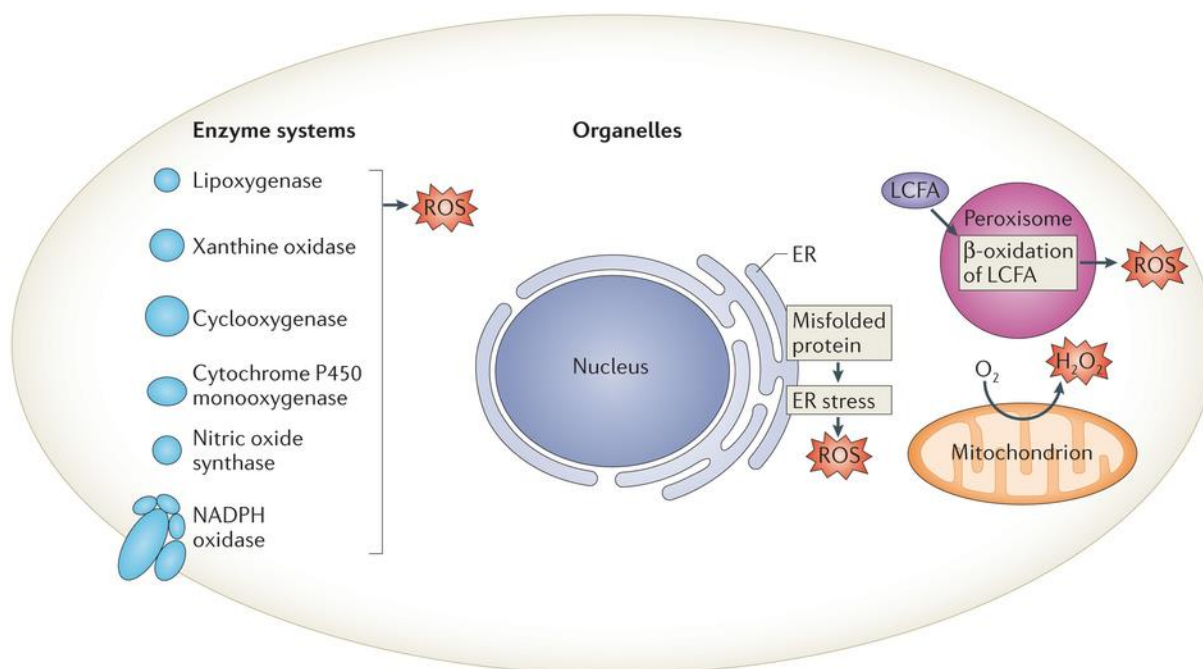


Figura 4: Principais geradores celulares de ROS. Várias organelas celulares podem gerar ROS, incluindo mitocôndrias, retículo endoplasmático e peroxissomos. Além disso, várias enzimas incluindo oxidases e oxigenases geram ROS a partir de reações enzimáticas. ER- retículo endoplasmático, LCFA- ácidos graxos de cadeia longa. Fonte: (HOLMSTRÖM; FINKEL, 2014).

As ROS são geralmente formadas através do mecanismo de oxi-redução do oxigênio. O oxigênio possui dois elétrons desemparelhados em orbitais separados em sua camada externa. Esta estrutura eletrônica faz com que o oxigênio seja especialmente susceptível à formação de radicais. A redução sequencial do oxigênio molecular leva a formação de radicais livres, os quais são estruturas com elétrons desemparelhados altamente reativos e instáveis, como o $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$, NO e outros que possuem uma maior estabilidade como H_2O_2 e $ONOO^-$ (BHATTACHARYA, 2015).

O ânion $O_2^{\bullet-}$, é gerado através da reação de redução do O_2 , por meio de vários sistemas como a NADPH-oxidase, xantina oxidase e peroxidases. Essa reação ocorre geralmente nas membranas mitocondriais. Uma vez gerado, o $O_2^{\bullet-}$, participa em várias reações diferentes produzindo outras ROS como o H_2O_2 , $\bullet OH$, $ONOO^-$ e $HOCl$ (PHAM-HUY et al., 2008).

O H_2O_2 é formado a partir da redução do $O_2^{\bullet-}$, não sendo considerado um radical, mas de extrema importância pois gera o $\bullet OH$. O $\bullet OH$ é o radical livre mais reativo *in*

vivo, sendo formado pela reação de $O_2^{\bullet-}$ com o H_2O_2 na presença de Fe^{2+} ou Cu^{+} (reação de Fenton) (PHAM-HUY et al., 2008). A Figura 5 resume a formação das principais ROS:

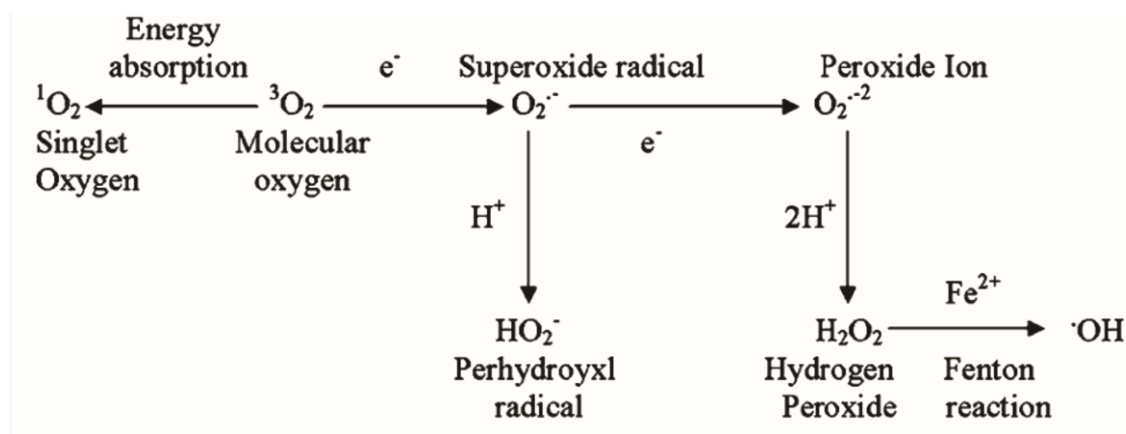


Figura 5: Representação esquemática da geração de ROS. A redução de um único elétron do O_2 resulta na geração de $O_2^{\bullet-}$. A dismutação de $O_2^{\bullet-}$ gera $O_2^{\bullet-2}$, o qual após protonação resulta na geração de H_2O_2 . Novamente, $O_2^{\bullet-}$ pode ser protonado para formar o HO_2^{\bullet} . Na presença de metais de transição tais como cobre e ferro, ocorre a reação de Fenton formando o $\bullet OH$. Fonte: (BHATTACHARYA, 2015).

Em relação ao tempo de atuação no organismo, o $O_2^{\bullet-}$ e o $\bullet OH$ são espécies reativas que possuem uma meia vida limitada e normalmente agem localmente. Em contraste o H_2O_2 possui uma meia vida longa, permitindo desse modo agir em locais distantes de seu sítio de geração, além de possuir a capacidade de atravessar camadas lipídicas facilmente, agindo no interior das células e gerando o radical $\bullet OH$ (CHEN; KEANEY, 2012).

In vivo, existem vários mecanismos que controlam a produção de ROS, os quais estão divididos em mecanismos antioxidantes enzimáticos e antioxidantes não enzimáticos. Os mecanismos celulares antioxidantes diretamente envolvidos na neutralização de ROS são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GRX) (PHAM-HUY et al., 2008).

A SOD é a primeira linha de defesa contra os radicais livres. Ela catalisa a transformação $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 . O H_2O_2 formado posteriormente é transformado em H_2O e O_2 através da enzima CAT ou GPx. A GPx remove o H_2O_2 , utilizando uma

glutathiona reduzida (GSH) e uma glutathiona oxidada (GSSG) (PHAM-HUY et al., 2008; BHATTACHARYA, 2015). As reações estão exemplificadas na Figura 6:

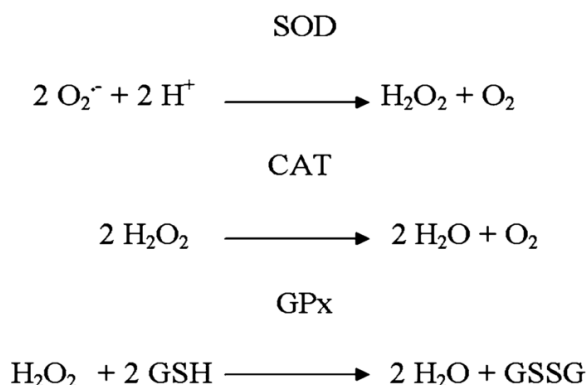


Figura 6: Enzimas antioxidantes e as reações que elas catalizam. SOD-superóxido dismutase, CAT-catalase, GPx- glutathiona peroxidase, GSH-glutathiona reduzida, GSSH-glutathiona oxidada. Fonte: (BHATTACHARYA, 2015).

Dentre os antioxidantes não enzimáticos o GSH é provavelmente o mais importante antioxidante presente em células. Portanto, as enzimas que geram GSH são essenciais para a proteção contra o estresse oxidativo. Além dele, existe um número grande de outros compostos que atuam como antioxidantes, entre eles o NADPH, vitamina E (alfa-tocoferol) e vitamina C (ácido ascórbico) (BHATTACHARYA, 2015).

Portanto, em um estado fisiológico normal, a concentração de ROS não resulta em danos ao organismo, pois são constantemente degradados pelos antioxidantes. Além disso, as ROS são de extrema importância para o organismo, pois participam de uma grande variedade de funções fisiológicas como ações contra microorganismos, transdução de sinal, síntese de hormônios da tireóide; reprodução; apoptose e necrose (POUROVA et al., 2010). Porém, se houver produção exacerbada de ROS pode ocorrer oxidação de substratos biológicos como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (BHATTACHARYA et al., 2014).

As principais ROS que reagem com lipídeos são $\cdot\text{OH}$ e ONOO^- . Quando em excesso atuam danificando membranas celulares e das lipoproteínas por um processo denominado de peroxidação lipídica. Esta reação conduz à formação de

malondialdeído e compostos de dieno conjugado, os quais são citotóxicos e mutagênicos para as células. Além disso, a peroxidação lipídica ocorre por uma reação em cadeia, ou seja, uma vez iniciado se espalha rapidamente e afeta um grande número de moléculas lipídicas (PHAM-HUY et al., 2008). Da mesma forma proteínas também podem ser danificadas por ROS levando a mudanças estruturais e perda de atividade enzimática (HALLIWELL, 2007; PHAM-HUY et al., 2008). Em relação ao DNA, os danos oxidativos conduzem à formação de diferentes lesões que podem causar mutações e mudanças na expressão gênica (PHAM-HUY et al., 2008). Desse modo as ROS podem levar ao envelhecimento celular e tecidual contribuindo para o desenvolvimento de uma grande variedade de doenças como as doenças neurodegenerativas, diabetes, câncer e DCVs incluindo aterosclerose (MORRELL, 2008; TAVERNE et al., 2013).

Em relação as DCVs, como no caso mais específico da aterosclerose, muitos dos componentes patogênicos da doença estão ligados ao estresse oxidativo. Por exemplo, a oxidação de LDL, a disfunção endotelial e processos inflamatórios são mediados por um aumento da produção de ROS (CHEN; KEANEY, 2012). Evidências sugerem que fatores de risco para aterosclerose, como a hipercolesterolemia, aumentam o risco de produção de ROS livre a partir das células endoteliais e células musculares lisas. Portanto a hipercolesterolemia aumenta a produção de ROS e estes podem induzir disfunção endotelial, o qual é um dos passos iniciais da aterosclerose (VOGIATZI et al., 2009; PARK; PARK, 2015). Além disso, o aumento na produção das ROS causado pela hipercolesterolemia, causa a oxidação das LDL gerando LDL-ox, as quais são facilmente fagocitadas por macrófagos aumentando ainda mais a produção de ROS (VOGIATZI et al., 2009).

A hipercolesterolemia estimula a produção de $O_2^{\bullet-}$ a partir das células musculares lisas dos vasos levando a um aumento na oxidação de LDL (VOGIATZI et al., 2009). O aumento na produção de $O_2^{\bullet-}$ leva também a uma diminuição na produção de NO pelo endotélio, resultando em vasoconstrição, agregação de plaquetas e adesão dos neutrófilos ao endotélio. Já o aumento na produção de H_2O_2 leva a produção de fatores que participam na expressão de moléculas de adesão, aumentando a ligação

de neutrófilos ao endotélio e alterando a permeabilidade vascular (VOGIATZI et al., 2009).

Portanto, em condições fisiológicas normais, a produção de ROS pelas enzimas oxidantes é contrabalanceada pelos mecanismos antioxidantes do organismo. Porém, em situações de grande produção de ROS, como no caso da hipercolesterolemia e aterosclerose, as defesas antioxidantes não são suficientes para controlar sua produção, resultando em um ambiente com elevado estresse oxidativo e desse modo podem causar danos as biomoléculas como proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA.

1.3 Introdução às Células-Tronco

Células-tronco, por definição, são um conjunto de células indiferenciadas, com capacidade de se renovar por meio de divisões mitóticas assimétricas, por longos períodos sem mudanças significativas em suas propriedades gerais (MORRISON et al., 1997).

As principais características das células-tronco são a sua capacidade de autorrenovação (*self-renewal*) e multipotencialidade. Desse modo, é possível sua multiplicação e manutenção de seu estado indiferenciado, proporcionando uma reposição ativa de sua população de maneira constante nos tecidos. Além disso, sua multipotencialidade permite a sua proliferação em diversos tipos celulares dentro de um mesmo tecido (MORRISON et al., 1997; LEMISCHKA, 2005; NOMBELA-ARRIETA et al., 2011; WEI et al., 2013).

Em relação ao seu local de origem as células-tronco podem ser divididas em dois grandes grupos: 1) Células-Tronco Embrionárias (CTEs) e 2) Células-Tronco Adultas (CTAs). As CTEs são um conjunto de células derivadas da massa celular interna do blastocisto embrionário, podendo se diferenciar em todos os tipos de células

somáticas, bem como células germinais quando injetadas em um blastocisto, formando todas as três camadas germinativas embrionárias *in vitro* (endoderma, mesoderma e ectoderma) (CAN, 2008).

As CTAs estão presentes em tecidos específicos em estágios de desenvolvimento posterior ao estado embrionário, possuindo a capacidade de autorrenovação e de geração de diferentes células de uma linhagem específica além da capacidade de reconstituir tecidos e órgãos. Podem ser encontradas principalmente na medula óssea, sangue periférico, córnea, retina, cérebro, pâncreas, entre outros (CAN, 2008).

A segunda e mais funcional classificação de células-tronco é baseada de acordo com o seu potencial de desenvolvimento. Assim, elas podem ser classificadas como células-tronco totipotentes, pluripotentes, multipotentes e onipotentes (DÍEZ VILLANUEVA et al., 2012; LIN et al., 2012). Célula totipotente, como por exemplo o zigoto, pode dar origem a um novo indivíduo se fornecido o suporte materno apropriado. A medida que ocorre o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, as células passam a ser classificadas como pluripotentes, apresentando um potencial mais restrito, uma vez que podem originar a quase todos os tecidos do corpo, porém são incapazes de produzir um novo indivíduo (DÍEZ VILLANUEVA et al., 2012; LIN et al., 2012). Células-tronco multipotentes, como por exemplo células-tronco mesenquimais (CTMs) e células-tronco hematopoiéticas (CTHs), apresentam um potencial de diferenciação mais restrito que as CTEs, uma vez que originam poucos tipos celulares, além de células diferenciadas pertinentes a seu tecido de origem (DÍEZ VILLANUEVA et al., 2012; LIN et al., 2012). Finalmente, células-tronco unipotentes, tais como células-tronco espermatogônias (CSCs), apresentam ainda seu potencial de auto-renovação, sendo seu potencial de desenvolvimento limitado, podendo dar origem a apenas um tipo restrito de células, tais como no caso das CSCs o esperma (DÍEZ VILLANUEVA et al., 2012; LIN et al., 2012; LOS ANGELES, DE et al., 2015).

1.3.1 Células-Tronco Mesenquimais

CTMs podem ser definidas como uma população heterogênea de células, as quais possuem características como capacidade de proliferação *in vitro*, aderência ao plástico, morfologia do tipo fibroblastóide, formação de colônias *in vitro* e capacidade de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condrócitos (UCCELLI et al., 2008). A capacidade de diferenciação das CTMs está representada na Figura 7:

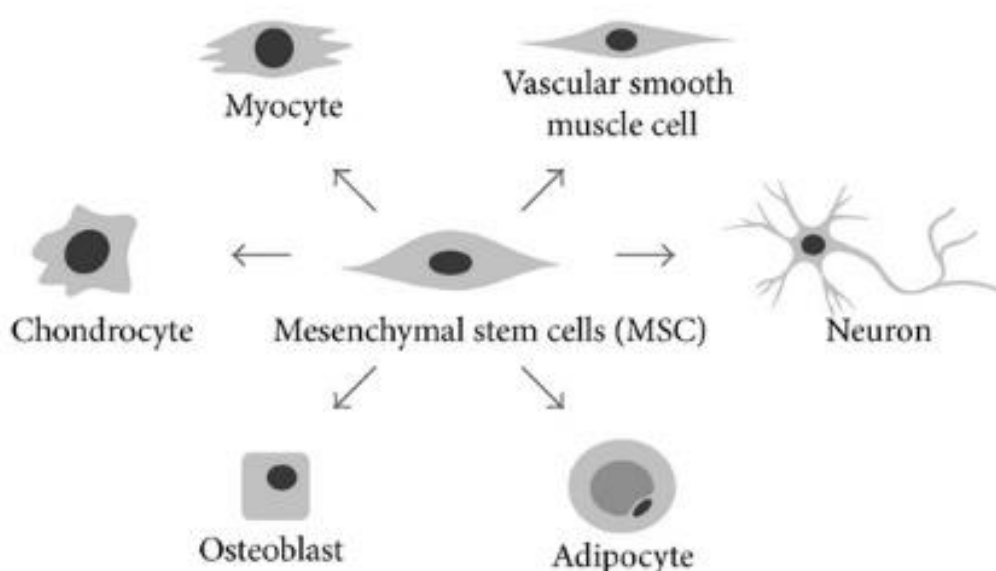


Figura 7: Capacidade de diferenciação das CTMs de medula óssea. Fonte: (JAMES, 2013).

As CTMs foram primariamente descritas pelo pesquisador russo Friedenstein e seus colaboradores, na década de 1970, após estudos em medula óssea de murinos e posteriormente de humanos. Ele as descreveu como sendo uma fração não hematopoiética de células da medula óssea, com morfologia semelhante a fibroblastos e alta capacidade de adesão à superfície plástica (PROCKOP, 1997; WATT et al., 2013).

Em 1991, Caplan sugeriu a expressão “células-tronco mesenquimais” para descrever a capacidade de diferenciação dessas células em cartilagem e osso. Posteriormente, Pittenger et al., 1999 demonstrou a multi-potencialidade dessa linhagem celular após observações que demonstravam sua capacidade de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica após expansões clonogênicas *in vitro* (WATT et al., 2013).

Em 2006, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (International Society for Cellular Therapy -ISCT), definiu os critérios mínimos para definição de células-tronco mesenquimais. De acordo com a ISCT, uma determinada população de células será classificada como célula-tronco mesenquimal quando apresentar três características-chave: 1) isolamento com base nas suas propriedades de adesão seletiva à superfície do material onde são cultivadas (geralmente plástica); 2) expressão de determinados antígenos de membrana e, 3) que as células possam ser diferenciadas em tecido ósseo, gorduroso e cartilaginoso após indução (DOMINICI et al., 2006).

As CTMs podem ser facilmente isoladas em uma grande variedade de tecidos como medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical, fígado, músculo e pulmão (WEI et al., 2013). No entanto as CTMs isoladas da medula óssea são as mais caracterizadas e utilizadas na pesquisa devido a facilidade de isolamento e expansão de células a partir desta fonte *in vitro* (PEISTER, 2004; UCCELLI et al., 2008).

Após extração, as CTMs por aderência ao plástico, podem ser facilmente isoladas e expandidas por meio de repique celular, em meio contendo altas concentrações de soro fetal bovino (SFB) (WALKER et al., 2011). Diferentemente de outras células-tronco, como células-tronco embrionárias, as CTMs em cultura exibem um potencial de expansão limitada *in vitro* (5-10 passagens) (WALKER et al., 2011).

Em relação aos antígenos de superfície, segundo a ISCT (2006), as CTMs quando cultivadas sob condições padrão devem expressar CD 73, CD90, CD105 e não expressar os marcadores CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79, CD19 (DOMINICI et al., 2006). Adicionalmente é conhecido que as CTMs expressam diferentes

marcadores de superfície de acordo com o tecido de origem e espécie a qual as CTMs foram isoladas. No caso de camundongos, as CTMs derivadas da medula óssea apresentam principalmente os antígenos CD 29, CD 44, CD 105 e SCA-1 (BOXALL; JONES, 2012).

Em relação à morfologia, as CTMs apresentam, após isolamento a partir da medula óssea de murinos e humanos e sob condições padronizadas de cultura (SFB 10%), uma morfologia fusiforme (*fibroblast-like morphology*) durante as passagens iniciais. Após extensivas passagens em cultura algumas CTMs continuam apresentando uma morfologia do tipo fibroblastóide, no entanto a maioria das células apresenta morfologia característica de células com senescência replicativa como células largas e achatadas (PASQUINELLI et al., 2007; KARAÖZ et al., 2011)

As CTMs de medula óssea são uniformes em termos de ultraestrutura, geralmente apresentando características de células desenvolvidas e metabolicamente ativas (KARAÖZ et al., 2011). CTMs isoladas de camundongos, ratos e humanos são morfologicamente idênticas em termos de ultraestrutura, apresentando muitos pequenos pseudópodes ao redor de toda a célula. Além disso, as CTMs possuem duas características ultraestruturais principais que as distinguem de fibroblastos: 1) possuem um núcleo excêntrico e de formato irregular, possuindo geralmente um ou múltiplos nucléolos; 2) possuem uma zona citoplasmática interior, geralmente ao redor do núcleo rica em organelas, especialmente com mitocôndrias arredondadas e alongadas e aparelho de Golgi proeminente. Além disso, o retículo endoplasmático rugoso está presente tanto ao redor do núcleo como em zonas mais internas, possuindo muitas vesículas e vacúolos, dando ao citoplasma um aspecto vacuolizado (RAIMONDO et al., 2006; PASQUINELLI et al., 2007; KARAOZ et al., 2009; KARAÖZ et al., 2011; MANTOVANI et al., 2012). Além do exposto, é conhecido que CTMs possuem propriedades tais como multipotência, variabilidade de proliferação, potencial de migração; secreção de várias citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento; e funções imunomoduladoras (LEE et al., 2015). Todas essas características das CTMs as tornam excelentes candidatas para aplicações terapêuticas em diversas doenças (POLCHERT et al., 2008; WEI et al., 2013; LEE et al., 2015). Existem até o momento 344 casos clínicos registrados em diferentes

fases de estudo envolvendo a aplicação de CTMs. As porcentagens desses ensaios em diversas doenças estão representadas na Figura 8:

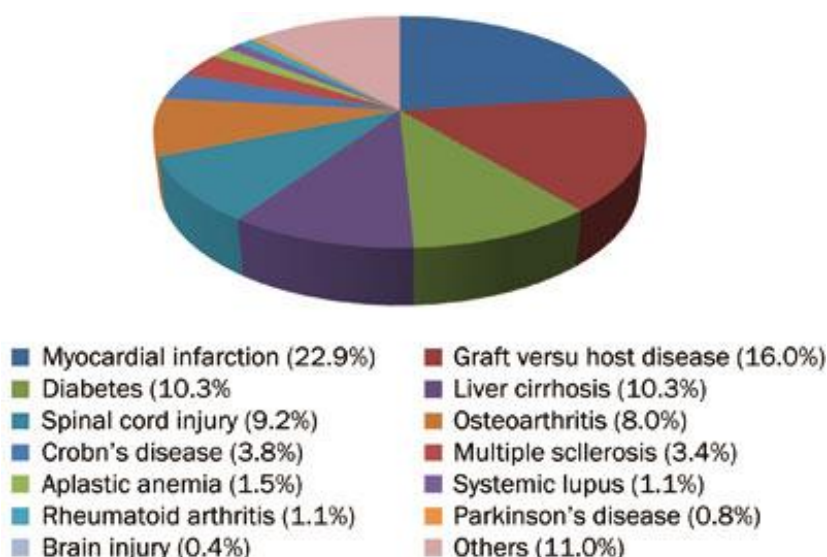


Figura 8: Porcentagens de ensaios clínicos envolvendo CTMs em doenças. Fonte: (WEI et al., 2013).

1.4 Efeitos do Estresse Oxidativo Sobre Células-Tronco Mesenquimais

Como mencionado anteriormente, devido suas características e propriedades, as CTMs estão sendo cada vez mais usadas na prevenção de diversas doenças. No entanto, existe uma série de fatores que podem influenciar o potencial terapêutico das CTMs, sendo o aumento da produção de ROS um fator determinante.

A medula óssea é uma das principais fontes de CTMs no organismo (JIN et al., 2013). Em seu nicho, as células estão dispostas em um ambiente com baixa tensão de oxigênio, os quais são necessários para a sobrevivência, expansão e proliferação celular (RAY et al., 2012). Além disso, o estado oxidativo das células é regulado por um balanço controlado entre produção e eliminação de ROS, através da geração de antioxidantes endógenos (SART et al., 2015; ATASHI et al., 2015).

Níveis de ROS em células-tronco, têm uma clara correlação com funções celulares. Baixos níveis de ROS funcionam como moléculas de sinalização, mediando a proliferação, migração e diferenciação celular, além da expressão gênica (MARALDI et al., 2015). Como exemplo, baixas concentrações de H_2O_2 , de origem exógena, aumentam a proliferação e migração celular, além de regular sua função secretora. Desse modo as CTMs estão aptas para migrar para os locais de reparo e ou dano tecidual e exercer suas funções (SART et al., 2015).

Por outro lado, algumas doenças produzem excesso de ROS, as quais podem afetar o microambiente da medula óssea, prejudicando a homeostase das CTMs. O estresse oxidativo criado prejudica a adesão das células, além de promover danos ao DNA, encurtamento dos telômeros e parada do ciclo celular, levando desse modo, a senescência e apoptose (SART et al., 2015).

Portanto, existe um equilíbrio entre a geração de ROS e síntese de antioxidantes, os quais regulam a homeostase das CTMs na medula óssea. Dessa forma os níveis basais de ROS são necessários para a ativação de várias vias celulares essenciais para a proliferação e sobrevivência das CTMs. Entretanto, a acumulação excessiva de ROS na medula óssea, leva a perda das funções celulares, além de induzir senescência e apoptose celular.

1.4.1 Senescência Celular

Senescência celular pode ser definida como uma parada irreversível da proliferação celular promovendo um declínio na homeostase de tecidos de mamíferos (BORODKINA et al., 2014). Além do prejuízo homeostático, essas células passam a exibir alterações fenotípicas, alterações na expressão gênica e encurtamento dos telômeros (FYHRQUIST et al., 2013; DEURSEN, VAN, 2014).

Os primeiros a introduzir o termo “senescência” foram Hayflick e Moorhead (1961), para descrever o fenômeno de parada irreversível do ciclo celular de células

humanas diplóides após extensivas passagens em cultura (DEURSEN, VAN, 2014). Essa limitada capacidade replicativa é conhecida como o “limite de Hayflick” (HAYFLICK, 1965) e esse tipo de senescência é denominado como senescência replicativa (DEURSEN, VAN, 2014). Similarmente a outros tipos celulares que apresentam um limite na capacidade de divisão, as CTMs se submetem a senescência replicativa após um número fixo de divisões celulares. No entanto se as CTMs forem alvos de substâncias que causam estresse celular como ROS, luz ultravioleta e radiação gama podem entrar em um estado de senescência prematura (BORODKINA et al., 2014).

Uma variedade de estressores intrínsecos e extrínsecos pode ativar a senescência celular prematura. Esses estressores envolvem diversas cascatas de sinalização celular, mas finalmente ativam p53, p16 ou ambos. O estresse oxidativo causa senescência prematura das CTMs através da ativação contínua de respostas de dano ao DNA (*DNA damage response* -DDR). ROS promovem ativação de DDR provocando alterações na transcrição gênica e replicação do DNA, bem como encurtamento dos telômeros (DEURSEN, VAN, 2014). Os mecanismos que os agentes estressores causam senescência celular estão representados na Figura 9.

Após desenvolvida a senescência, as células passam a apresentar características distintas das células originais. Primeiramente, como já dito, elas entram em um estado de parada irreversível do ciclo celular (KUILMAN et al., 2010). Em relação a morfologia, as células apresentam um formato irregular e achatado, aumentam de tamanho, podendo algumas vezes apresentar o dobro do tamanho de uma célula normal, com núcleos alargados e ou múltiplos, citoplasma disperso, complexo de Golgi proeminente e vacuolização do citoplasma. (KUILMAN et al., 2010; RODIER; CAMPISI, 2011; BECKER; HAFERKAMP, 2013). Além disso, células senescentes em cultura apresentam aumento na atividade da enzima β -galactosidase devido a uma expansão no compartimento lisossomal. O aumento da enzima β -galactosidase pode ser medido em pH 6 e representa a principal forma de identificação de células senescentes (KUILMAN et al., 2010).

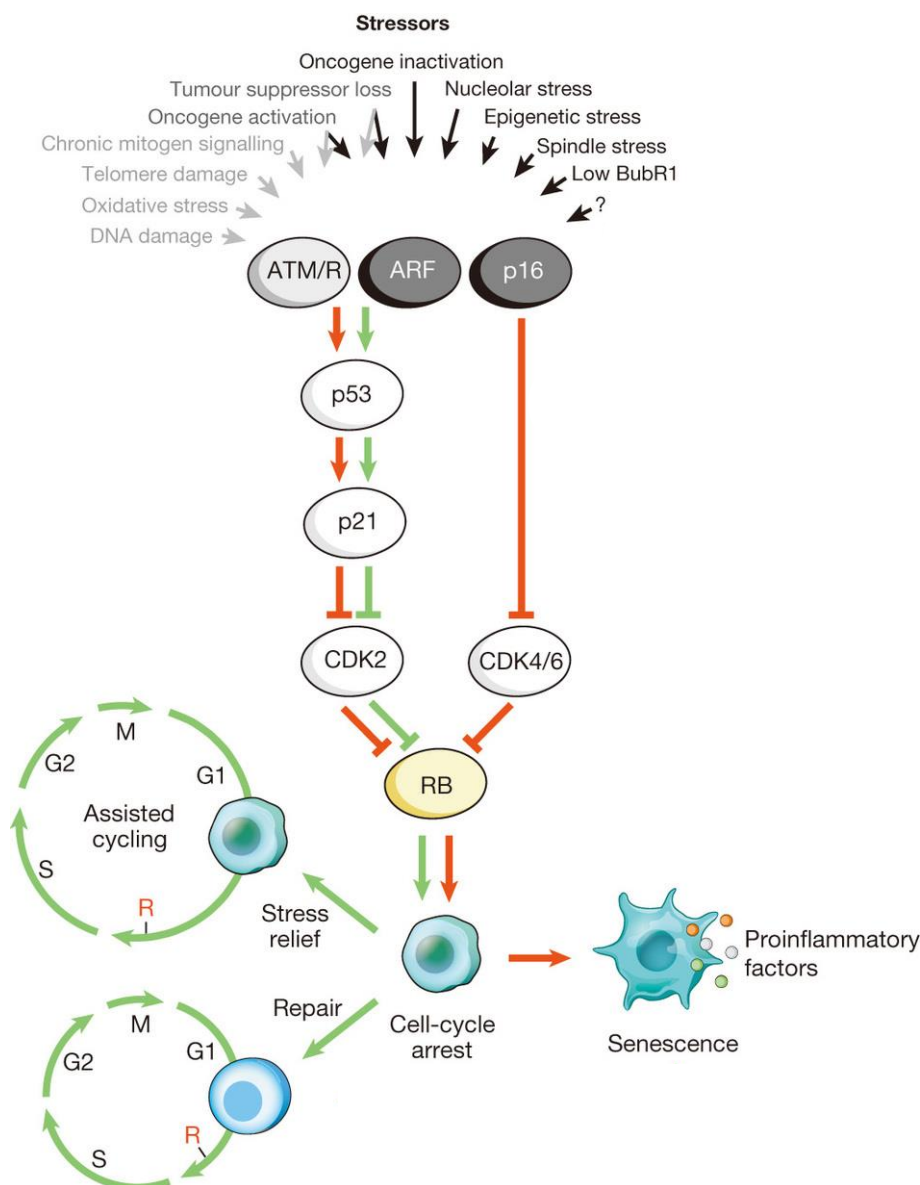


Figura 9: Mecanismos de ativação da senescência celular. Uma grande variedade de agentes estressores celulares intrínsecos e extrínsecos podem ativar a senescência celular. Os agentes estressores envolvem diversas cascatas de sinalização celular e ativam p53, p16INK4a ou ambos. Tipos de estresses que ativam p53 através de sinalização DDR são indicados através das setas cinza (ROS provocam ativação da DDR perturbando a transcrição gênica e replicação de DNA, bem como, encurtando os telômeros). A P53 uma vez ativada induz p21, a qual induz uma paragem do ciclo celular por inibição da ciclina Cdk2. p16INK4a também inibe a progressão do ciclo celular, mas através da segmentação da ciclina D-CDK4 e ciclina D-Cdk 6. Tanto p21 e p16INK4a agem impedindo a inativação do Rb, resultando em contínuo repressão de genes E2F requeridos para o início da fase S. Após forte estresse (setas vermelhas), as células entram em um estado de parada do ciclo celular. As células expostas a danos leves podem ser reparadas com sucesso e retomar a progressão normal do ciclo celular. Células que sofrem senescência induzem um estado pró-inflamatório (pontos coloridos). Fonte: Adaptado de (DEURSEN, VAN, 2014).

1.4.2 Apoptose

A morte celular é um fenômeno biológico básico fundamental para o desenvolvimento e regulação da homeostase nos tecidos (FAVALORO et al., 2012).

A morte de uma célula pode ser definida como uma perda irreversível da integridade da membrana plasmática. Existem três tipos de morte celular, as quais são distinguíveis em células de mamíferos por critérios morfológicos. O tipo de morte celular I, mais conhecida como apoptose, é um tipo de morte celular programada, definido por alterações características na morfologia nuclear. O tipo de morte celular II é caracterizada por um acúmulo de vacúolos autofágicos de dupla membrana no citoplasma. O tipo de morte celular III, mais conhecido como necrose, é muitas vezes definido como uma forma negativa de morte celular o qual não são observadas as características dos processos do tipo I e tipo II (GOLSTEIN; KROEMER, 2007).

A apoptose é um evento geneticamente controlado, atuando no desenvolvimento do tecido e homeostase. Ela é definida por um padrão de alterações morfológicas e moleculares que resultam no isolamento e remoção de células. As células comprometidas com a morte por apoptose são removidas pelos fagócitos para impedir uma resposta imune do hospedeiro (CHIPUK; GREEN, 2006).

A apoptose também ocorre como um mecanismo de defesa, tais como em reações imunes ou quando as células são danificadas por doenças ou agentes nocivos. Embora haja uma grande variedade de estímulos e condições, tanto fisiológicos e patológicos, que podem desencadear apoptose, nem todas as células necessariamente morrem em resposta ao mesmo estímulo (ELMORE, 2007).

Morfologicamente, a morte celular por apoptose descreve o colapso programado de uma célula caracterizado por vesiculação da membrana, retração celular, condensação da cromatina (picnose), fragmentação do DNA (cariorrexe), pequenas alterações em organelas citoplasmáticas, encolhimento global da célula, vesiculação

da membrana e formação de corpos apoptóticos os quais contêm materiais nucleares ou citoplasmáticos seguido por rápida fagocitose por células vizinhas. Todas essas alterações ocorrem antes da perda na integridade da membrana plasmática, não liberando desse modo material citoplasmático para o meio extracelular. A apoptose distingue-se da morte celular por necrose principalmente pela ausência de uma resposta inflamatória associada (RENEHAN, 2001; GOLSTEIN; KROEMER, 2007). As principais características das diferentes formas de morte celular estão representadas na Figura 10.

Duas principais vias moleculares levam à morte celular por apoptose: a via extrínseca e a via intrínseca. A via extrínseca da apoptose é uma forma de morte induzida por sinais extracelulares resultantes da ligação de ligantes em receptores de membrana específicos. Todos os receptores de morte funcionam de uma maneira semelhante: após a ligação várias moléculas receptoras são reunidas e submetidas a alterações conformacionais que permitem a montagem de um grande complexo multi-proteína conhecida como complexo de sinalização e iniciação de morte (*Death Initiation Signalling Complex* -DISC) o qual induz a ativação de caspases, levando a morte celular (FAVALORO et al., 2012).

A via intrínseca de apoptose inicia-se na mitocôndria e é ativada por estresses intra ou extracelulares. A via intrínseca é ativada em resposta a um número de condições de tensão, incluindo danos no DNA, estresse oxidativo entre outros. Em todos os casos as várias formas de estresse convergem para as mitocôndrias e aumentam a permeabilidade da membrana mitocondrial externa resultando na dissipação do potencial de membrana mitocondrial e consequentemente na cessação da produção de (*adenosine triphosphate*-ATP), assim como liberação de uma série de proteínas que contribuem para a ativação das caspases, liberação do citocromo c para o citoplasma e aumento de ROS (FAVALORO et al., 2012).

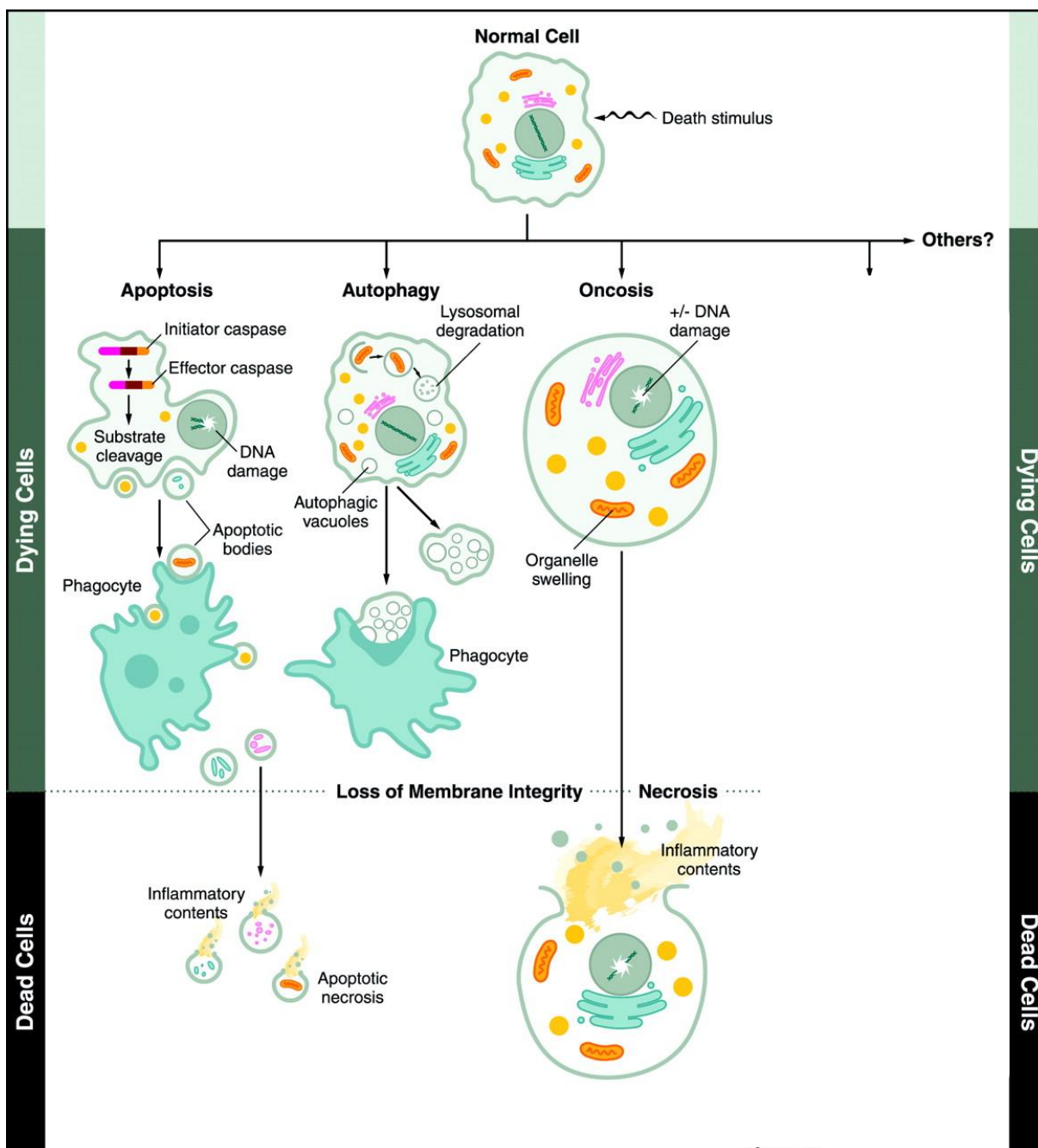


Figura 10: Vias que conduzem à morte celular. As células saudáveis respondem a estímulos indutores de morte e iniciam uma grande variedade de vias moleculares que conduzem à morte celular. A apoptose conduz à morte da célula através da ativação de caspases iniciadoras as quais ativam caspases efetoras, que clivam substratos celulares. As células apoptóticas demonstram condensação citoplasmática e nuclear, danos no DNA, formação de corpos apoptóticos, manutenção de uma membrana plasmática intacta e exposição de moléculas de superfície para a fagocitose. Na ausência de fagocitose, os corpos apoptóticos podem proceder a lise e necrose ou apoptose secundária. Autofagia apresenta a degradação de componentes celulares dentro da célula intacta em vacúolos autofágicos. As características morfológicas de autofagia incluem vacuolização, degradação do conteúdo citoplasmático e ligeira condensação da cromatina. Células autofágicas também podem ser fagocitadas. Necrose leva à morte celular, a qual é acompanhado por inchaço celular e de organelas com posterior liberação de conteúdo celular inflamatório. Fonte: Adaptado de (FINK; COOKSON, 2005).

2 JUSTIFICATIVA

Estudos demonstram que células-tronco mesenquimais (CTMs) apresentam propriedades como multipotência, variabilidade de proliferação, potencial de migração, secreção de várias citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, além de funções imunomoduladoras (LEE et al., 2015). Desse modo, a terapia com CTMs vem sendo frequentemente utilizada em ensaios clínicos envolvendo doenças que acometem grande parte da população e que acarretam custo elevado para o sistema de saúde como aterosclerose (PORTO et al., 2011), infarto do miocárdio (LEE et al., 2009), danos à córnea (RODDY et al., 2011) e diabetes (EL-BADRI; GHONEIM, 2013).

Apesar de existirem muitos estudos que avaliem a aplicação de CTMs no tratamento de doenças, pouco se sabe sobre a funcionalidade das CTMs originadas da medula óssea de indivíduos doentes, para aplicação em terapia celular. Portanto, no presente trabalho, investigamos a influência da hipercolesterolemia sobre as CTMs da medula óssea de camundongos apoE^{-/-}.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da hipercolesterolemia sobre células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de camundongos apoE^{-/-}.

3.2 Objetivos Específicos

No plasma de camundongos C57 (normocolesterolêmico) e apoE^{-/-} (hipercolesterolêmico):

- Avaliar a colesterolemia;
- Determinar o nível de estresse oxidativo;

Em células-tronco mesenquimais de camundongos C57 e apoE^{-/-}:

- Determinar o nível de estresse oxidativo;
- Determinar a porcentagem de células apoptóticas;
- Determinar a porcentagem de células senescentes;
- Caracterizar morfolologicamente;

4 METODOLOGIA

4.1 Animais Experimentais

Foram utilizados 6 (seis) camundongos controles (*Mus musculus*) C57BL/6 (C57) e 6 (seis) camundongos *knockout* para apoliproteína E (apoE^{-/-}) machos, com 2 meses de idade, pesando cerca de 28 gramas. Todos os animais foram provenientes do biotério do Laboratório de Fisiologia Translacional, pertencente ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, com garantia de serem animais isogênicos. Os animais receberam água e ração *ad libitum* e tiveram controlado o ciclo de 12 horas claro/escuro, bem como temperatura (22±2°C) e umidade (70%) do ambiente. A utilização dos animais foi realizada de acordo com normas estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e a *American Physiological Society* (APS). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (CEUA-EMESCAM) sob o protocolo número 005-2013.

4.2 Dosagem Plasmática de Colesterol Total, Colesterol LDL e Triglicérides

Os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésico tiopental sódico (150mg/kg, intraperitoneal) e o sangue coletado através de punção intracardíaca para posterior análise bioquímica. O sangue foi coletado e imediatamente centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos. As dosagens de colesterol total, triglicérides e colesterol LDL em soro de camundongos foram realizados pelo método enzimático colorimétrico de acordo com as instruções do fabricante - BIOCLIN[®]. As amostras, após hidrólise enzimática e oxidação do soro, foram lidas em um espectrofotômetro (Biospectro SP-220) a 500 nm (nanômetros) para colesterol total e triglicérides e em 546 nm para colesterol LDL. A intensidade da cor

obtida após reação de cada amostra foi diretamente proporcional à concentração de colesterol total, triglicérides e LDL na mesma quando comparada com um padrão de concentração conhecida.

4.3 Análise de Produtos Avançados de Oxidação Proteica – AOPP

A determinação plasmática de produtos avançados de oxidação proteica (*Advanced Oxidation Protein Products* - AOPP) foi realizado por espectrofotometria em uma leitora de microplacas de acordo com (WITKO-SARSAT et al., 1996).

Em situações de estresse oxidativo, proteínas podem ser oxidadas formando resíduos de aminoácidos carbonilados ou de ditirosina (DiTyr) e estas analisadas em comparação às reações de agentes oxidantes como as cloraminas (COLOMBO et al., 2015).

Cerca de 200 µL de plasma foram adicionados em cada tubo e diluídos em 1:5 com PBS (*Phosphate Buffered Saline* -Sigma-Aldrich, USA) e 10 µL de 1,16 M de iodeto de potássio (KI). Posteriormente foi adicionado em cada tubo 20 µL de ácido acético. Após 2 minutos foi lida a absorbância da reação em 340 nm. O branco da reação continha 200µL de PBS, 20µL de ácido acético e 10µL de KI. O conteúdo de AOPP foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 µM de equivalentes de cloramina T. Os resultados foram expressos em µMol de equivalentes de cloramina T/mg proteína.

4.4 Isolamento de Células Mononucleares da Medula-óssea e Separação das Células-tronco Mesenquimais

Após anestesia com anestésico tiopental sódico (150mg/kg, intraperitoneal), houve remoção de fêmures e tíbias dos animais (n=6). As respectivas epífises foram

cortadas e realizado *flush* da medula utilizando meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Sigma-Aldrich, USA). A suspensão de medula óssea foi centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, as células ressuspensas em DMEM e as células mononucleares (CMN) isoladas utilizando gradiente de densidade (1500rpm por 30 minutos). Após a centrifugação, as CMN foram cuidadosamente transferidas para um tubo cônico, onde foram lavadas com solução salina tamponada e centrifugadas a 1200rpm por 10 minutos. Por fim, as CMN foram ressuspensas em 1 ml de DMEM e uma alíquota separada para contagem em câmara de *Neubauer*.

Para separação das CTMs as CMN foram centrifugadas a 1200rpm por 10 minutos, ressuspensas em 3,5 ml de DMEM acrescido de 10% SFB, penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100µg/mL), colocadas em placas de cultura e incubadas à 37°C, em atmosfera úmida, contendo CO₂. Após sete dias, as células que aderiram à placa de cultura, onde se encontram as CTMs, foram lavadas e incubadas com solução de tripsina (0,25%) e EDTA (0,5%) por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado DMEM acrescido de 10% SFB, a suspensão celular transferida para um tubo cônico e centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos (ALLSOPP et al., 2001; ESLAMINEJAD et al., 2006).

4.5 Análise das Células-tronco Mesenquimais por Citometria de Fluxo

4.5.1 Caracterização Fenotípica

Amostras de CTMs, em quinta passagem, foram analisadas para identificação e confirmação de sua natureza mesenquimal através da análise imunofenotípica para identificação de antígenos específicos expressos na superfície celular. A análise foi realizada com os anticorpos específicos contra: CD 29 (BD -Becton Dickinson, San Juan, CA, USA), CD 44 (BD) 105 (BD) e Sca-1(BD), associados a diferentes fluorocromos e seus respectivos controles de isotipo, de acordo com protocolo do

fabricante. Para análise, as células foram incubadas com 5µL de anticorpo marcador ou anticorpo controle no escuro por 30 minutos à temperatura de 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas em PBS para remoção do excesso de anticorpo e finalmente realizada a aquisição de 10.000 – 50.000 eventos no citômetro de fluxo (FACSCanto II - BD -Becton Dickinson, San Juan, CA, USA) acoplado a um computador. Os dados adquiridos foram analisados pelos softwares FACSDiva (BD -Becton Dickinson, San Juan, CA, USA) e FCSExpress (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA) (Porto, 2015).

Posteriormente, no citômetro de fluxo, as CTMs de ambos os grupos foram analisadas para determinação de seus respectivos tamanhos e complexidade interna ou granulosidade.

4.5.2 Determinação dos Níveis Citoplasmáticos de Espécies Reativas de Oxigênio

Para quantificação de ROS intracelulares ($O_2^{\bullet-}$, NO e H_2O_2) por citometria de fluxo, amostras de CTMs, na quinta passagem, foram analisadas através da mediana da intensidade de fluorescência emitida pelos marcadores dihidroetídeo (DHE), 2',7' - diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) e 4,5- diaminofluoresceína-2/diacetato (DAF).

Para determinar os níveis intracelulares de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 foi usado o DHE e DCFH-DA, respectivamente. O DHE é uma forma reduzida do brometo de etídeo. Em seu estado reduzido é livremente permeável a células e se liga rapidamente com $O_2^{\bullet-}$ se oxidando e formando o etídeo. O etídeo posteriormente se liga ao DNA e amplifica o sinal de fluorescência vermelha (TONINI et al., 2013).

O DCFH-DA é permeável à célula e indica produção intracelular de H_2O_2 . Não é fluorescente até entrar na célula e sofrer oxidação por esterases intracelulares, resultando na formação de um composto intermediário (DCFH). O DCFH pode ser

oxidado pelo H_2O_2 presente na célula, formando um composto fluorescente (diclorofluoresceína-DCF), o qual é apolar e fica retido no interior celular (TONINI et al., 2013).

Para estimar o teor de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , 10^6 células foram ressuspensas em 1 ml de PBS e incubadas com 20 μL de DHE e 20 μL de DCF-DA por 30 minutos a 37°C no escuro. Posteriormente, as células foram lavadas, ressuspensas em PBS e imediatamente levadas para o citômetro de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson, San Juan, CA, USA). Para controle positivo, amostras foram tratadas com 50 μM de H_2O_2 por 5 minutos e para controle negativo células foram incubadas com etanol.

Para determinar os níveis intracelulares de NO, foi usado o diacetato de 4,5 diaminofluoresceína (DAF-2D). O DAF-2D, emite fluorescência verde na presença de NO, sendo sua intensidade proporcional a biodisponibilidade intracelular de NO (TONINI et al., 2013). A suspensão de CTMs foi incubada com o DAF-2D a 37°C por 180 minutos no escuro. Como controle positivo, amostras foram incubadas com 10 μM de nitroprusianato de sódio.

Para a quantificação da fluorescência de DHE, DCF e DAF as células foram excitadas a 488 nm e a fluorescência foi detectada utilizando filtros de banda de 585/42 para DHE e 530/30 para DCF e DAF. Os dados foram expressos como a intensidade de fluorescência média (MFI).

4.5.3 Determinação da Apoptose Celular

Para determinação da apoptose celular foi utilizada a marcação com o reagente *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit*® (BD -Becton Dickinson, San Juan, CA, USA), composto da proteína anexina V conjugada à fluoresceína (FITC).

A anexina V é uma proteína dependente de cálcio que possui alta afinidade para a fosfatidilserina dos fosfolípidios de membrana. Em células normais a fosfatidilserina

encontra-se situada na face interna da membrana plasmática, entretanto, quando o processo de morte celular programada (apoptose) é iniciado ela é translocada para a face externa, permitindo a ligação da proteína anexina V. A anexina V pode ser conjugada a um fluorocromo (fluoresceína) e assim servir como uma sonda sensível para análise de células apoptóticas através da citometria de fluxo (HINGORANI et al., 2011).

Para análise, alíquotas de 200 μL de células em quinta passagem, foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos. Em seguida, 1×10^6 células/mL foram ressuspensas em 400 μL de tampão *Binding Buffer* 10% (10mmol HEPES, NaOH, pH7,4, 140mmol NaCl, 2,5mmol CaCl_2). Em seguida, 100 μL desta solução (1×10^5 células) foram transferidos para um novo tubo, onde receberam 2,5 μL de anexina V-FITC. Após incubação por 15 minutos, na ausência de luz, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 1200 rpm, adicionados a cada tubo 400 μL de PBS com 10% SFB e as amostras analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto II, (BD - Becton Dickinson, San Juan, CA, USA). Para controle positivo foi utilizado peróxido de Hidrogênio (H_2O_2). A análise dos dados foi realizada com auxílio do *software* FACSDiva (BD -Becton Dickinson, San Juan, CA, USA) (Tonini, 2013).

4.6 Determinação da Senescência Celular Associada a β -Galactosidase

Para determinação da senescência celular foi utilizado o kit *Senescence Cells Histochemical Staining* (Sigma-Aldrich, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. A técnica se baseia na marcação histoquímica da β -galactosidade celular em pH 6. Nessas condições as células que apresentam atividade da enzima β -galactosidade são coradas em azul se diferenciando das células não senescentes.

Para realização da técnica, as amostras de CTMs em quinta passagem, foram semeadas em uma concentração de 5×10^5 células por poço. Após aderência foram lavadas 1 vez com PBS para retirada do meio de cultura. Posteriormente foram

fixadas com tampão de fixação por 7 minutos em temperatura ambiente. Após nova lavagem com PBS as células foram incubadas com uma solução contendo 1 mM de MgCl_2 , 4,9 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 4,7mM de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ e 2,4 mM de X-gal em PBS por 5 horas em uma incubadora a 37°C e sem a presença de CO_2 . Posteriormente as CTMs foram analisadas e as imagens obtidas com câmera acoplada a um microscópio Nykon (Nykon Eclipse Ti, Melville, NY, USA), com uma objetiva de 20 vezes. Foram analisadas 1050 células por grupo estudado em campos aleatórios. Os dados foram expressos como porcentagem de células marcadas em azul em relação as não marcadas.

4.7 Caracterização Morfológica das Células-tronco Mesenquimais

4.7.1 Características morfológicas das Células-tronco Mesenquimais em Cultura

Para determinação das características morfológicas das CTMs em cultura, células em quinta passagem foram analisadas e fotografadas por uma câmera acoplada a um microscópio Nykon (Nykon Eclipse Ti, Melville, NY, USA), utilizando uma objetiva de 10 vezes.

4.7.2 Análise Morfométrica Celular e Nuclear

Para análise morfométrica celular e nuclear das CTMs em cultura, células em quinta passagem foram fotografadas por uma câmera acoplada a um microscópio Nykon (Nykon Eclipse Ti, Melville, NY, USA), utilizando uma objetiva de 10 vezes. Foi quantificada a área celular e nuclear de 90 células por grupo estudado, utilizando a ferramenta “*freehand selections*” do software *Image J* versão 1.4.8 (National

Institutes of Health, Bethesda, USA). Foram excluídas da morfometria células anucleadas, células situadas nas bordas da imagem e células sobrepostas. A metodologia utilizada para análise morfométrica está representada de forma simplificada na Figura 11:

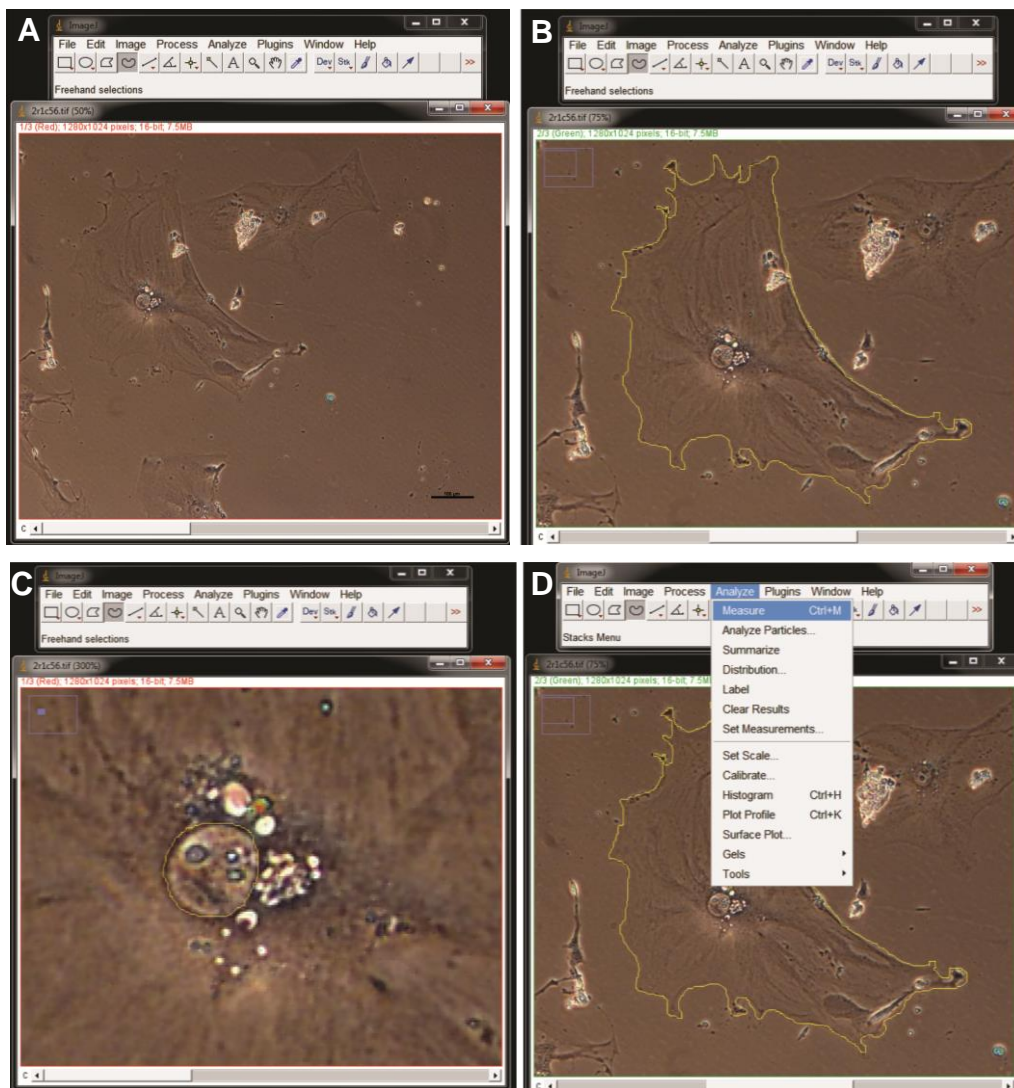


Figura 11: Análise morfométrica celular e nuclear das CTMs em cultura. Figura (A): Imagem original aberta pelo programa. Figura (B): Uso da ferramenta “freehand selections” para contorno da célula analisada. Figura (C): Uso da ferramenta “freehand selections” para contorno do núcleo celular analisado. Figura (D): Quantificação da área ocupada pela célula e ou núcleo celular em μm^2 em relação à área total da imagem. Barra de escala: 100 μm .

4.7.3 Análise Ultraestrutural

Células em quinta passagem, após confluência, foram lavadas com PBS (pH 7,2) para remoção de meio de cultura e fixadas em uma solução de glutaraldeído 2,5%(p/v) (Sigma-Aldrich, USA,) por 2 horas a temperatura ambiente. Após esse tempo, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) e pós-fixadas em tetróxido de ósmio (Sigma-Aldrich, USA) e ferrocianeto de potássio (Sigma-Aldrich, USA) por 45 minutos. Seguiu-se para desidratação em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 3 vezes em 100%) por 10 minutos cada. Após essa etapa as amostras foram infiltradas em etanol 100% e Epon® na proporção de 1:1, durante 8-12 horas em temperatura ambiente. Posteriormente foram incluídas em Epon® puro, durante 8-12 horas em temperatura ambiente e colocadas em estufa a 60°C por 48-72 horas.

A etapa de inclusão ocorreu dentro da placa de cultura, a qual posteriormente foi quebrada para retirada das amostras de células incluídas no Epon®. Uma parte da amostra foi cortada e fixada sobre um bloco de Epon® que serviu como apoio para a obtenção dos cortes. Seções ultrafinas (70 nanômetros) foram cortadas horizontalmente utilizando uma faca de diamante (Diatome, USA) em um ultramicrotomo (UCT, Leica Microsystems). Os cortes foram coletados e depositados em grades fendadas (EMS, USA) de cobre de 2mm x 1 mm e cobertas por uma fina camada de Formvar (EMS, USA). Para microscopia eletrônica de transmissão as grades foram contrastadas com acetato de uranila (Sigma-Aldrich, USA) por 30 minutos e citrato de chumbo (Sigma-Aldrich, USA) por 5 minutos e as imagens obtidas em um microscópio eletrônico de transmissão (JEM-1400, JEOL, USA inc).

4.8 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Foi aplicado o teste *t* de Student para amostras independentes. O *software* GraphPad Prism 6.0 (*GraphPad software, Inc, USA*) foi usado para análise estatística e obtenção dos gráficos. As diferenças foram consideradas significativas quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ou **** $p < 0,0001$.

5 RESULTADOS

5.1 Níveis Plasmáticos de Colesterol Total, Colesterol LDL e Triglicérides

Com o objetivo de demonstrar que o modelo apoE^{-/-} desenvolve hipercolesterolemia espontaneamente, realizamos a dosagem plasmática de colesterol total, colesterol LDL e triglicérides. Conforme esperado os animais apoE^{-/-} apresentam níveis plasmáticos de colesterol total (CT) e colesterol LDL superiores ao grupo controle C57. No entanto, em relação aos níveis de triglicérides plasmáticos, não foi possível observar diferença estatística significativa entre os grupos. Os dados estão expressos na tabela 1:

Tabela 1: Valores de colesterol total, LDL e triglicérides em camundongos C 57 e apoE^{-/-}.

Animais	Colesterol total mg/dL ± EPM	Colesterol LDL mg/dL ± EPM	Triglicérides mg/dL ± EPM
C 57	89,68 ± 5,69	45,41 ± 4,91	67,88 ± 6,63
ApoE ^{-/-}	276,4 ± 31,79 ***	84,52 ± 6,90 ***	90,50 ± 9,27

Nota: Os resultados estão expressos como média ± EPM. *** p< 0,001, Teste *t* de Student.

5.2 Níveis de Estresse Oxidativo Plasmático

Em situações de estresse oxidativo elevado, como em hipercolesterolemia e aterosclerose, as ROS podem oxidar proteínas e estas quantificadas indicando o nível de estresse oxidativo plasmático (COLOMBO et al., 2015).

Ao compararmos os grupos experimentais analisados, observamos que os animais hipercolesterolêmicos ($\text{apoE}^{-/-}$) apresentam uma concentração plasmática de AOPP significativamente maior que o grupo normocolesterolêmico (C57) ($\text{apoE}^{-/-}$: $29,83 \pm 3,58 \mu\text{mol/mg}$ vs. C57: $11,20 \pm 1,89 \mu\text{mol/mg}$). Os dados estão representados na Figura 12:

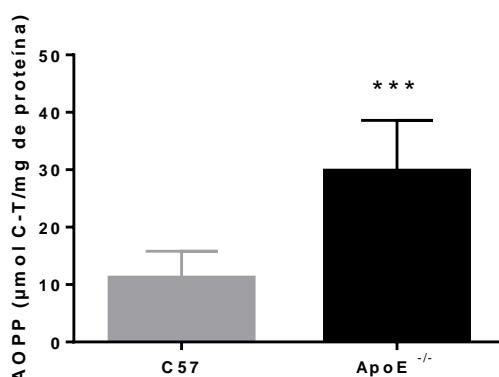


Figura 12: Concentração plasmática dos produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) em camundongos $\text{apoE}^{-/-}$ e C57. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$, Teste t de Student.

5.3 Análise das Células-tronco Mesenquimais por Citometria de Fluxo

5.3.1 Imunofenotipagem

A análise imunofenotípica das CTMs foi realizada com o objetivo de confirmar a natureza mesenquimal das células-tronco, após processo de extração da medula-óssea e subsequente cultura. Para isso, CTMs foram incubadas com anticorpos específicos conjugados com diferentes fluorocromos, os quais identificam antígenos expressos na superfície destas células. A Figura 13 mostra a incubação das CTMs com os anticorpos CD 29, CD 44, CD 105 e Sca-1 e seus respectivos controles de isotipo. Através da aquisição dos dados em citometria de fluxo, foi possível confirmar a natureza mesenquimal das células-tronco.

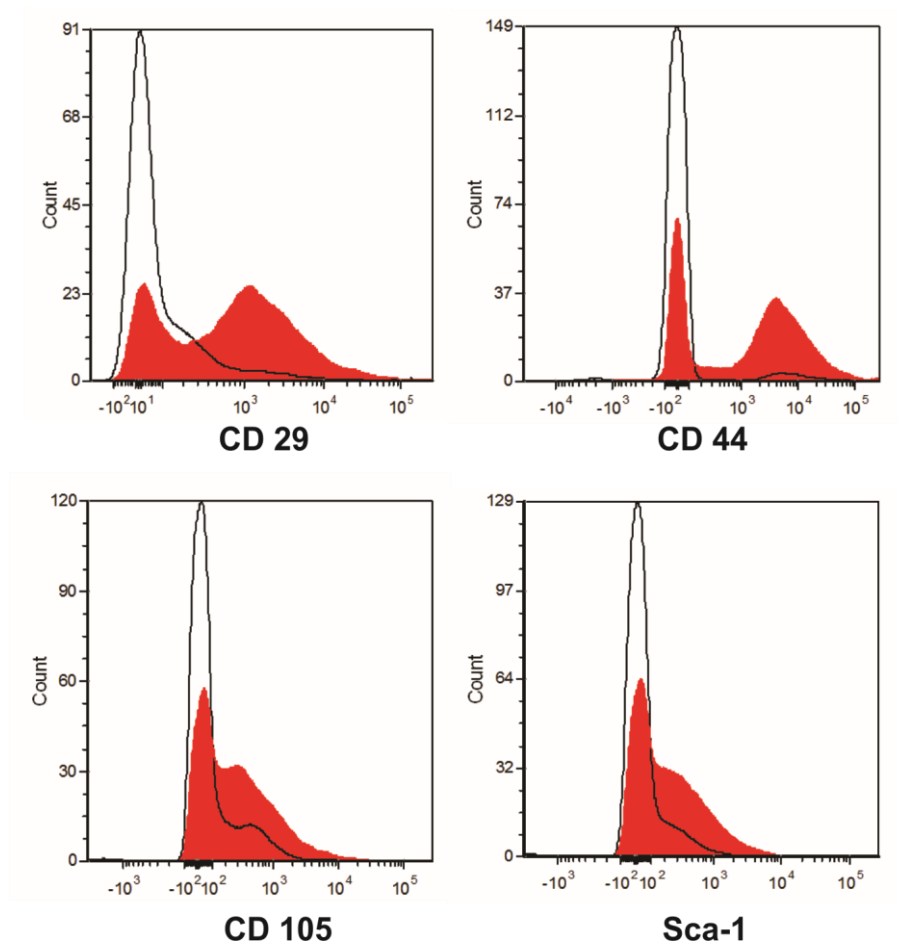


Figura 13: Caracterização imunofenotípica das CTMs. A linha vermelha não preenchida representa o controle de isotipo enquanto a linha vermelha preenchida representa o anticorpo da marcação.

5.3.2 Tamanho Celular e Complexidade Interna

Através da aquisição de dados em citômetro de fluxo, obtemos importantes informações sobre características das CTMs, tais como complexidade interna (SSC) e tamanho celular (FSC). Na Figura 14, podemos observar o tamanho médio (FSC) e granulosidade (SSC) das CTMs de ambos os grupos estudados. É possível observar que as CTMs da medula óssea de animais hipercolesterolêmicos ($\text{apoE}^{-/-}$) apresentam um aumento no tamanho celular se comparado ao grupo normocolesterolêmico ($\text{apoE}^{-/-}$: $30529 \pm 664,5$ a.u. vs. C57: $27429 \pm 589,8$ a.u.). Em relação à granulosidade não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos estudados ($\text{apoE}^{-/-}$: $21727 \pm 426,8$ a.u. vs. C57: $20165 \pm 919,1$ a.u.).

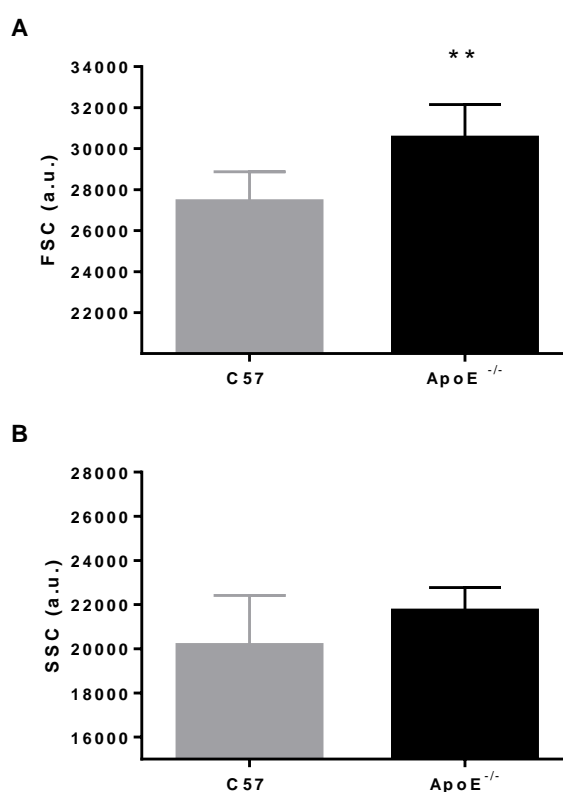


Figura 14: Gráficos de tamanho e complexidade interna de CTMs de camundongos $\text{apoE}^{-/-}$ e C57. Figura (A): gráfico de tamanho celular (FSC) das CTMs em a.u. (unidades arbitrárias). Figura (B): gráfico de complexidade interna (SSC) das CTMs em a.u. (unidades arbitrárias). Os resultados estão expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$, Teste t de Student.

5.3.3 Efeitos da Hipercolesterolemia sobre os Níveis Citoplasmáticos de Espécies Reativas de Oxigênio em Células-tronco Mesenquimais

Com o objetivo de demonstrar a influência da hipercolesterolemia sobre a produção de ROS intracelular em células-tronco mesenquimais, utilizamos a marcação com sondas específicas como DHE, DCF e DAF, as quais após penetração no citoplasma celular se ligam a moléculas como $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e NO, respectivamente, possibilitando assim a sua mensuração. A Figura 15 mostra as medianas de intensidade de fluorescência (MFI) para mensuração de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e NO. Pode-se observar um aumento significativo de 1,5 vezes na produção de $O_2^{\bullet-}$ (DHE), 1,4 vezes na produção de H_2O_2 (DCF) e 1,3 vezes na produção de NO (DAF) no grupo hipercolesterolêmico ($apoE^{-/-}$) se comparado com o grupo normocolesterolêmico (C57).

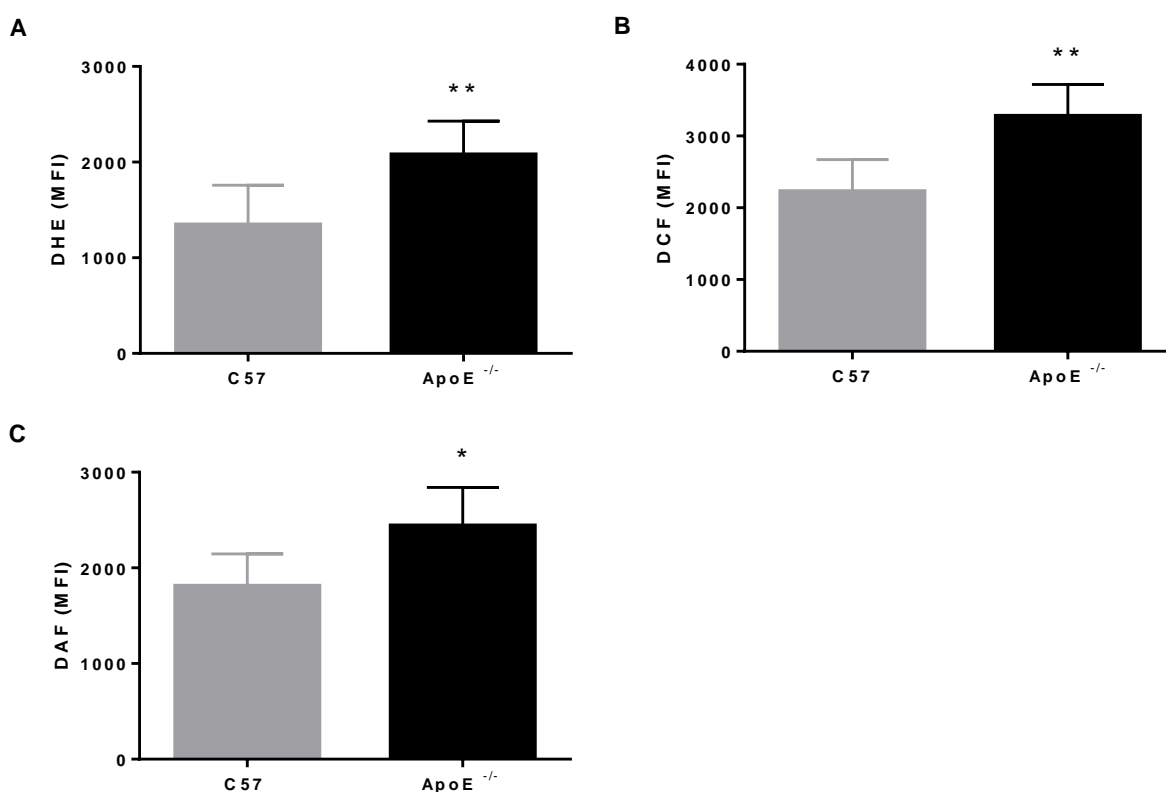


Figura 15: Efeitos da hipercolesterolemia sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em CTMs de camundongos $apoE^{-/-}$ e C57. Os gráficos de barras mostrados nas figuras (A), (B) e (C) representam as medianas de intensidade de fluorescência (MFI) de $O_2^{\bullet-}$ (DHE), H_2O_2 (DCF) e NO (DAF), respectivamente, medidas por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, Teste t de Student.

5.3.4 Efeitos da Hipercolesterolemia Sobre a Apoptose em Células-tronco Mesenquimais

Para identificação de células em apoptose, foi utilizada a anexina V⁺, a qual é uma proteína que se liga à fosfatidilserina da membrana plasmática. As células em apoptose apresentam fosfatidilserina translocada da face interna para externa da membrana celular, sendo assim possível a sua identificação após conjugação com fluorocromos e análise em citômetro de fluxo (HINGORANI et al., 2011).

Através da marcação com anexina V⁺ foi possível observar um aumento significativo na porcentagem de CTMs em apoptose nos animais hipercolesterolêmicos (apoE^{-/-}) quando comparado a porcentagem de CTMs em apoptose no grupo normocolesterolêmico (C57): (apoE^{-/-}: 7,48 ± 0,32% vs C57: 2,31 ± 0,15%). Esses resultados mostram que as CTMs de animais hipercolesterolêmicos apresentam um aumento aproximado de 3,2 vezes no percentual de apoptose se comparado com o grupo controle. Os dados estão representados na Figura 16:

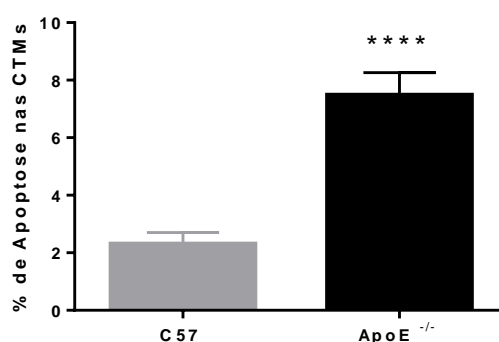


Figura 16: Efeitos da hipercolesterolemia sobre a porcentagem de apoptose celular em amostras de CTMs de animais apoE^{-/-} e C57. Os resultados estão expressos como média ± EPM. **** p < 0,0001, Teste t de Student.

5.4 Efeitos da Hipercolesterolemia Sobre a Senescência em Células-tronco Mesenquimais

Para avaliação da influência da hipercolesterolemia sobre a senescência em CTMs foi usada a técnica histoquímica para marcação da enzima β -galactosidase (β -gal), a qual está aumentada em lisossomos de células senescentes mas não em células normais. Desse modo é possível a quantificação da porcentagem de células senescentes (β -gal positivas) através da contagem de células coradas em azul em comparação com as células não coradas. Através da Figura 17 podemos observar que os animais $\text{apoE}^{-/-}$ apresentam $4,1 \pm 0,53\%$ das CTMs β -gal positivas enquanto o grupo C57 apresenta $0,7 \pm 0,12\%$ das CTMs β -gal positivas. Esses resultados mostram que os animais hipercolesterolêmicos apresentam um aumento aproximado de 6 vezes na porcentagem de células senescentes em comparação com o grupo normocolesterolêmico.

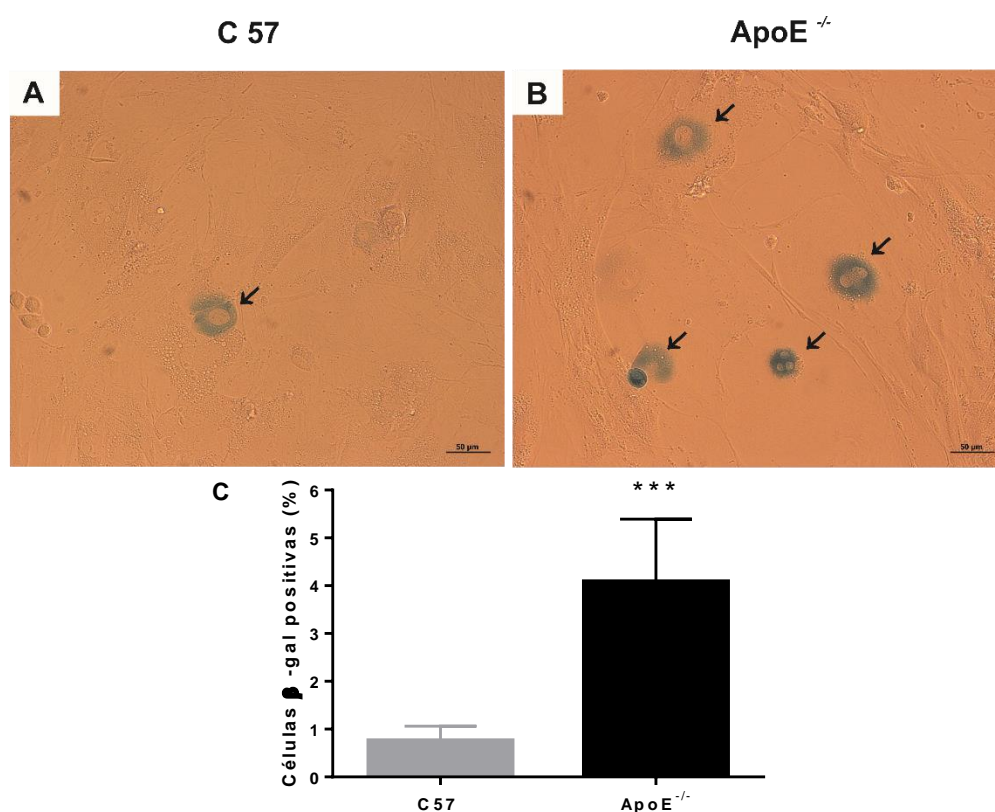


Figura 17: Influência da hipercolesterolemia sobre a senescência em CTMs. As figuras (A) e (B) são imagens representativas das CTMs de C57 e $\text{apoE}^{-/-}$, respectivamente, após marcação com a técnica histoquímica para identificação de células senescentes (\leftarrow). Figura (C): gráfico da porcentagem de células senescentes em animais $\text{apoE}^{-/-}$ e C57. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$, Teste t de Student. Barras de escala: 50 μm .

5.5 Efeitos da Hipercolesterolemia sobre a Morfologia das Células-tronco Mesenquimais

5.5.1 Morfologia em Cultura

A Figura 18 mostra CTMs em cultura, em quinta passagem. Podemos observar que as CTMs derivadas da medula óssea de camundongos normocolesterolêmicos (C57) apresentam morfologia do tipo fusiforme (*fibroblast-like morphology*) em cultura. Do mesmo modo, as CTMs derivadas da medula óssea de camundongos hipercolesterolêmicos (apoE^{-/-}) possuem, em sua maioria, uma morfologia do tipo fusiforme. No entanto podemos observar que algumas células possuem variações dessa morfologia, apresentando-se largas, achatadas e com vacuolização citoplasmática.

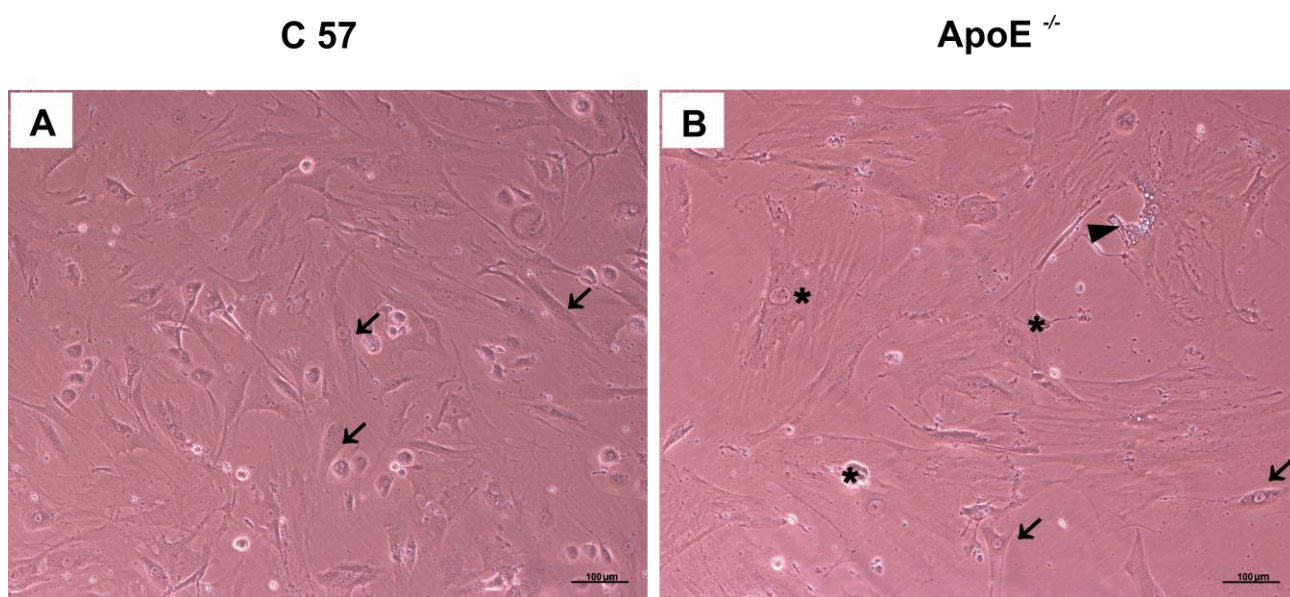


Figura 18: Morfologia das CTMs derivadas da medula óssea de camundongos apoE^{-/-} e C57. As figura (A) e (B) são imagens representativas de CTMs de camundongos C57 e apoE^{-/-}, respectivamente, em cultura. Células com morfologia fusiforme (←), células largas e achatadas (*) e célula com vacuolização citoplasmática (◄). Barras de escala: 100 µm.

5.5.2 Área Celular e Nuclear

Através da análise morfométrica foi possível determinar a área celular e nuclear das CTMs de camundongos C57 e apoE^{-/-} em cultura. Através da Figura 19 podemos observar que as CTMs de camundongos apoE^{-/-} apresentam um aumento na área celular se comparado com as CTMs de camundongos C57 (apoE^{-/-}: 6142 ± 603,6 μm² vs. C57: 3682 ± 267,7 μm²). Do mesmo modo, a área nuclear das CTMs também estava aumentada em camundongos apoE^{-/-} em relação ao grupo controle (apoE^{-/-}: 127,6 ± 8,31 μm² vs. C57: 106 ± 4,69 μm²). Esses resultados mostram que os camundongos hipercolesterolêmicos apresentam um aumento na área das CTMs de aproximadamente 1,7 vezes e de 1,2 vezes na área nuclear em relação às CTMs de animais normocolesterolêmicos.

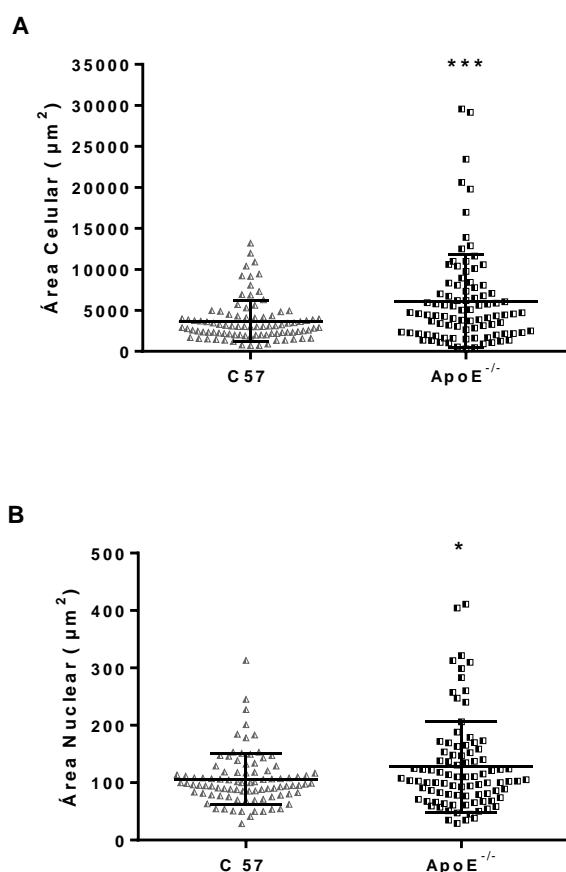


Figura 19: Área celular e nuclear das CTMs de camundongos apoE^{-/-} e C57. Figura (A): área celular das CTMs em μm². Figura (B): área nuclear das CTMs em μm². Os resultados estão expressos como média ± EPM. * p<0,05 e *** p<0,001, Teste t de Student.

5.5.3 Ultraestrutura

Através da análise ultraestrutural, foi possível observar que as CTMs advindas da medula óssea de animais normocolesterolêmicos (C57) e animais hipercolesterolêmicos (apoE^{-/-}) são similares em termos de ultraestrutura. No entanto, as CTMs derivadas da medula óssea de animais hipercolesterolêmicos apresentam variações em sua morfologia, quando comparadas à CTMs de animais normocolesterolêmicos (Figuras 20, 21 e 22).

As CTMs de animais normocolesterolêmicos apresentam núcleo eucromático, com formato geralmente regular e ou irregular e um ou mais nucléolos localizados próximos à cisterna perinuclear (Figura 20 A,C). O citoplasma dessas células é rico em organelas. As mitocôndrias são abundantes, com forma geralmente alongada e cristas evidentes (Figura 21A,D,E; Figura 22A). O complexo de Golgi é bem pronunciado e contém pilhas e cisternas com vesículas e vacúolos típicos (Figura 21C). O retículo endoplasmático rugoso é dilatado e está distribuído por todo o citoplasma (Figura 21E; Figura 22A). Essas células possuem ainda vários pequenos pseudópodes dispersos ao redor da célula (Figura 22A). Autofagossomos também foram observados (Figura 22C).

Assim como observado nas CTMs de animais normocolesterolêmicos, as CTMs de animais hipercolesterolêmicos apresentam um núcleo eucromático e de formato irregular. No entanto, núcleos com formato regular e arredondado foram frequentemente observados nesse grupo (Figura 20 B,D). Em contraste ao observado nas CTMs do grupo controle, algumas CTMs de animais hipercolesterolêmicos possuem alterações morfológicas em mitocôndrias, como mitocôndrias arredondadas, com cristas menos pronunciadas e rompimento de membranas externa e interna (Figura 21B,D,F; Figura 22B). Autofagossomos foram frequentemente observados (Figura 22D). Não foram observadas diferenças ultraestruturais significativas em relação ao complexo de Golgi, retículo endoplasmático rugoso e pseudópodes entre os grupos (Figura 21 D,F e Figura 22B).

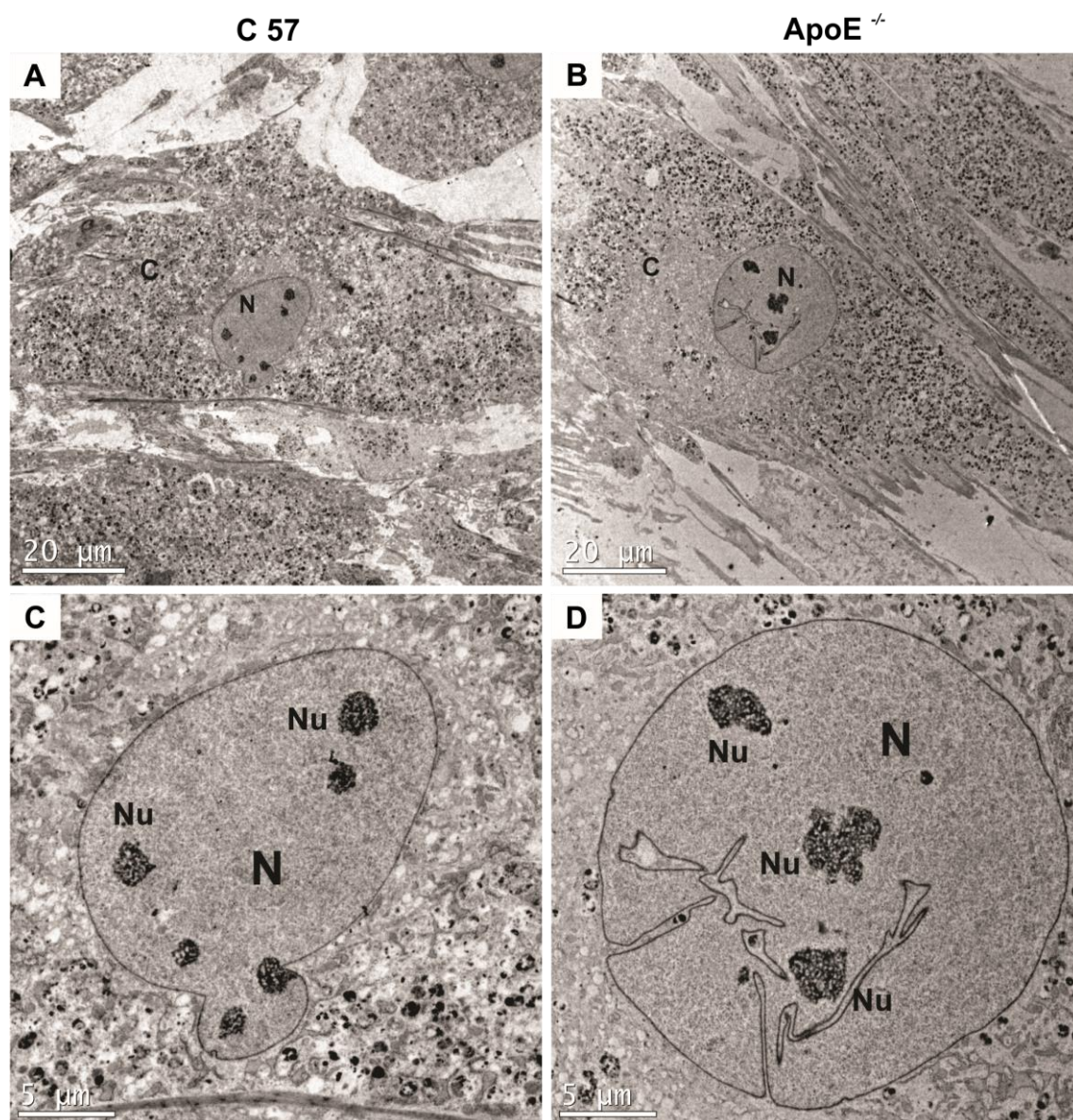


Figura 20: Micrografias eletrônicas de transmissão de CTMs de camundongos apoE^{-/-} e C57. Figuras (A) e (B): CTMs de camundongos C57 e apoE^{-/-}, respectivamente. Figuras (C) e (D): detalhes dos núcleos das CTMs. Núcleo (N), Nucléolos (Nu), Citoplasma (C). Barras de escala: (A) e (B) 20 μm; (C) e (D) 5 μm.

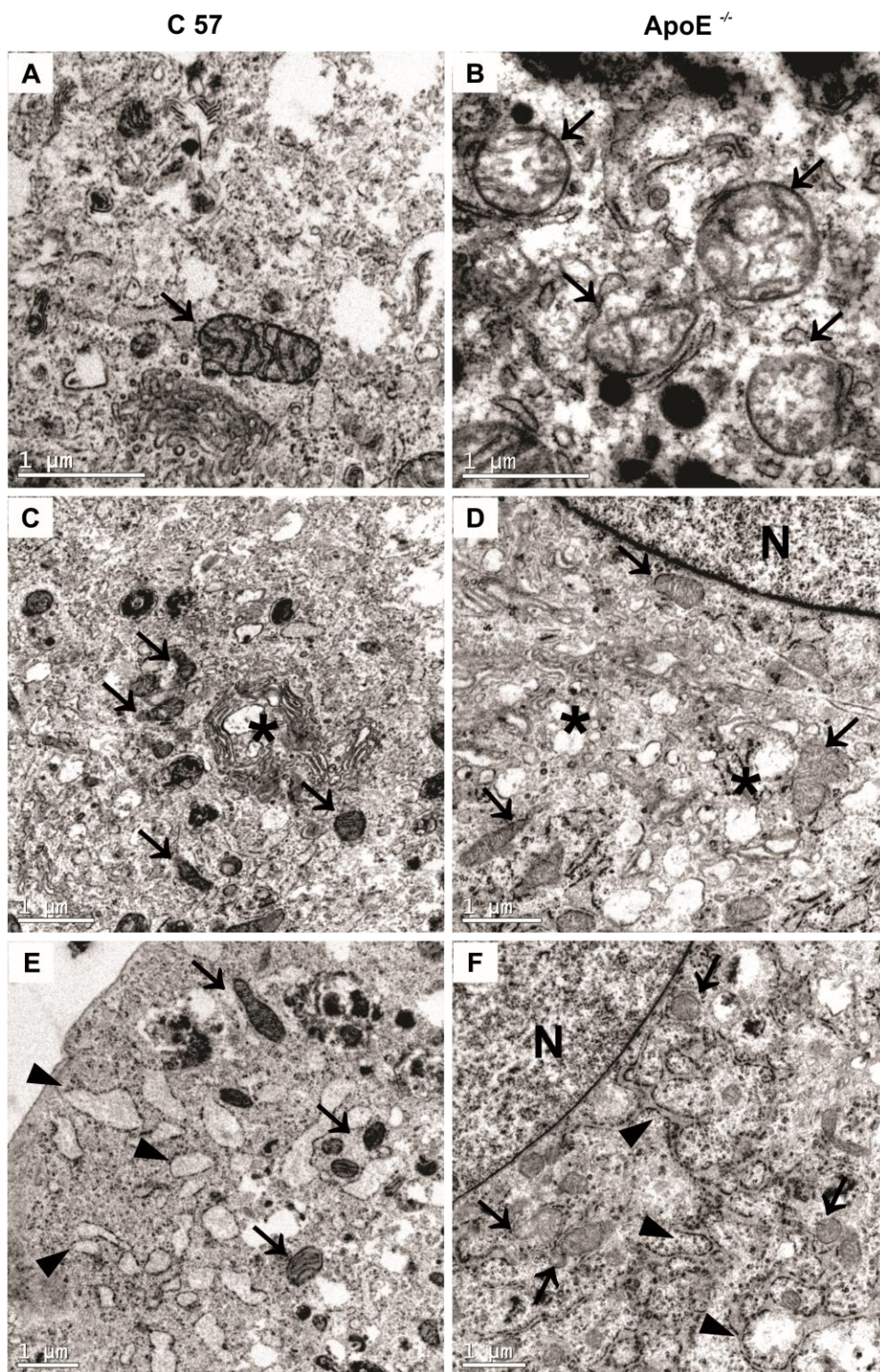


Figura 21: Micrografias eletrônicas de transmissão de CTMs de camundongos apoE^{-/-} e C57. Figuras (A) e (B): mitocôndrias (←) com formato alongado e cristas evidentes em CTMs de camundongos C57 e com formato arredondado e rompimento de cristas e membranas em CTMs de camundongos apoE^{-/-}. Figuras (C) e (D): citoplasma de CTMs de camundongos C57 e apoE^{-/-}, respectivamente, mostrando mitocôndrias (←) e complexo de Golgi com vesículas e vacúolos típicos (*). Figuras (E) e (F): citoplasma de CTMs de camundongos C57 e apoE^{-/-}, respectivamente, mostrando o retículo endoplasmático rugoso (◄) e mitocôndrias (←). Núcleo (N). Barras de escala: 1 μm.

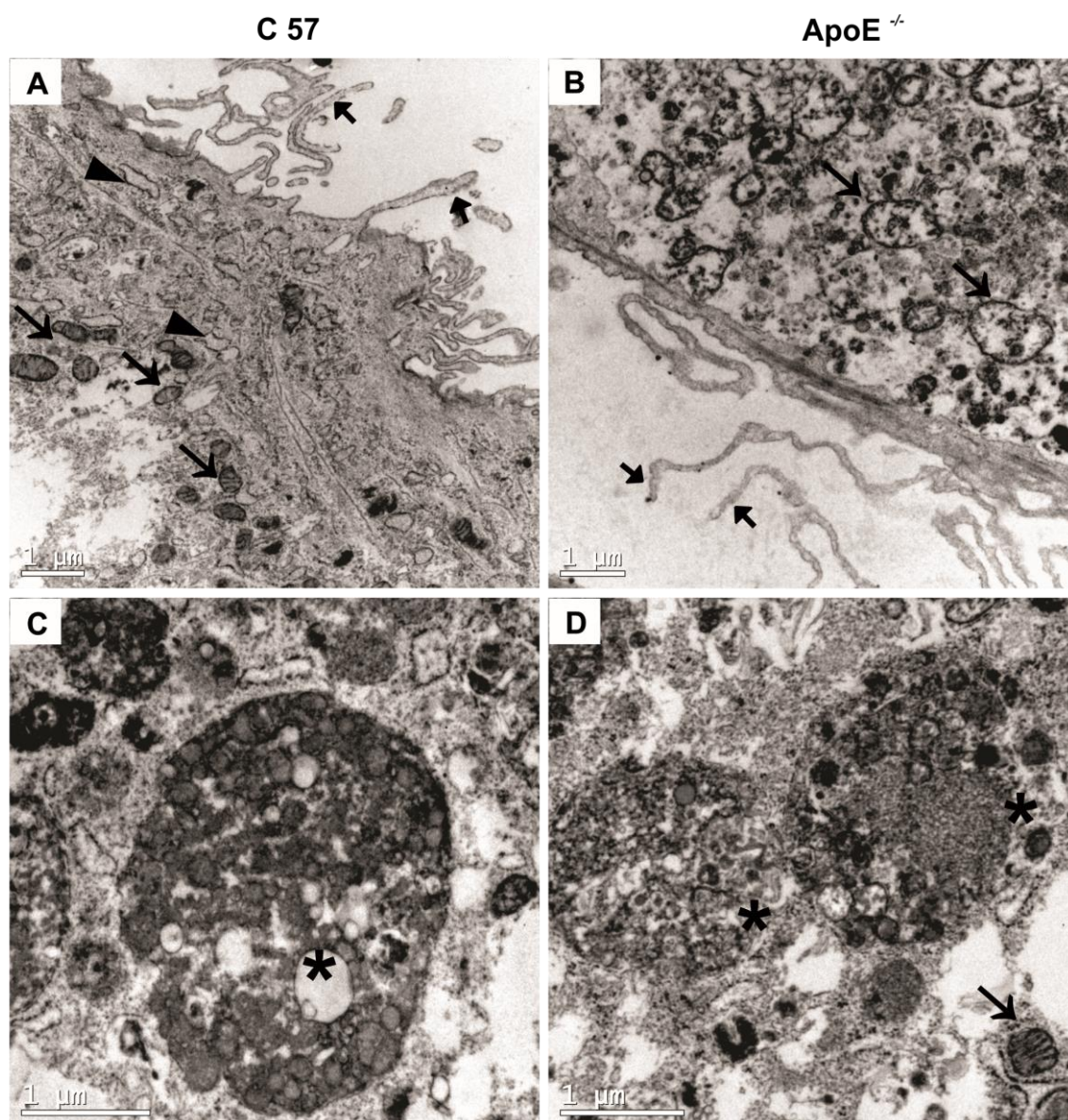


Figura 22: Micrografias eletrônicas de transmissão de CTMs de camundongos apoE^{-/-} e C57. Figuras (A) e (B): Pseudópodes (→), retículo endoplasmático rugoso (◄), mitocôndrias (◄). Figuras (C) e (D): Autofagossomos (*) e mitocôndrias (◄). Barras de escala: 1 μm.

6 DISCUSSÃO

CTMs adultas possuem propriedades tais como multipotência, variabilidade de proliferação, potencial de migração, secreção de várias citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento além de funções imunomoduladoras (LEE et al., 2015). Devido suas propriedades, as CTMs tem se tornado excelentes candidatas para aplicações terapêuticas em diversas doenças que acometem grande parte da população e que acarretam custo elevado para o sistema de saúde (POLCHERT et al., 2008; WEI et al., 2013) como aterosclerose (PORTO et al., 2011), infarto do miocárdio (LEE et al., 2009), danos à córnea (RODDY et al., 2011) e diabetes (EL-BADRI; GHONEIM, 2013).

Apesar de existirem muitos estudos que avaliem a aplicação de CTMs no tratamento de doenças, pouco se sabe sobre a funcionalidade das CTMs originadas da medula óssea de indivíduos doentes, para aplicação em terapia celular. Desse modo, no presente trabalho, investigamos a influência da hipercolesterolemia sobre as CTMs da medula óssea. Para isso, as CTMs foram isoladas a partir da medula óssea de camundongos selvagens (C57) e camundongos apoE^{-/-}, os quais desenvolvem altas taxas de colesterol plasmático/aterosclerose de forma espontânea.

A extração das CTMs da medula óssea foi baseada na técnica originalmente descrita por Friedenstein em 1976, com modificações por Soleimani e Nadri, 2009, a qual se baseia principalmente, na capacidade de aderência a superfície onde as CTMs são cultivadas para separação destas de outras frações celulares da medula óssea. Esta técnica permite que uma quantidade suficiente de células possa ser obtida facilmente, em uma quantidade razoável de tempo após o início da cultura (algumas semanas) (SOLEIMANI; NADRI, 2009).

Em 2006, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (International Society for Cellular Therapy -ISCT), definiu a necessidade de adoção de outros critérios, além do isolamento com base nas propriedades de adesão seletiva à superfície onde são cultivadas, para classificação de uma população de células como CTMs. A

identificação de determinados antígenos de membrana expressos por determinado tipo celular é uma das principais formas de identificação de uma população celular (BOXALL; JONES, 2012). No caso de CTMs da medula óssea de camundongos, os antígenos CD 29, CD 44, CD 105 e Sca-1 são os mais frequentemente utilizados para sua identificação (BOXALL; JONES, 2012). Diante disso, utilizamos em nosso estudo, a identificação desses antígenos, através de anticorpos específicos conjugados com fluorocromos e sua posterior análise em citômetro de fluxo, sendo possível desse modo a confirmação da natureza mesenquimal das CTMs utilizadas, após processo de isolamento e cultura celular.

O isolamento das CTMs foi realizada a partir de fêmures e tíbias de camundongos C57 e camundongos apoE^{-/-}. A fim de demonstrar que os camundongos apoE^{-/-} desenvolvem hipercolesterolemia espontaneamente, realizamos a dosagem plasmática de colesterol total, colesterol LDL e triglicérides, através de método enzimático colorimétrico. Conforme esperado os animais apoE^{-/-} apresentaram níveis plasmáticos de colesterol total (CT) e colesterol LDL superiores ao grupo controle C57.

Camundongos selvagens C57, quando alimentados com dieta padrão, apresentam taxas de colesterol total, triglicérides, VLDL+IDL, LDL e HDL de aproximadamente 60, 65, 20, 10 e 50 mg/dL respectivamente (PLUMP et al., 1992; ZHANG et al., 1992; STAPLETON et al., 2007; LEE et al., 2011; MEYRELLES et al., 2011). O perfil lipídico plasmático desses camundongos se constitui principalmente por um elevado nível de partículas de colesterol na fração HDL e baixas quantidades de colesterol nas frações aterogênicas LDL e VLDL (PENDSE et al., 2008). Isso explica os valores de colesterol total, colesterol LDL e triglicérides encontrados em camundongos C57 em nosso estudo. De outro modo, os camundongos apoE^{-/-} apresentaram níveis elevados de colesterol total e colesterol LDL.

Os camundongos apoE^{-/-} desenvolvem hipercolesterolemia e consequentemente aterosclerose, de forma espontânea, semelhantemente ao observado em humanos (VASQUEZ et al., 2012). Isso se deve ao desligamento do gene antiaterogênico da apolipoproteína E (apoE), o qual está envolvido no metabolismo do colesterol e é um

importante mediador do transporte e eliminação metabólica hepática. Desse modo, os camundongos apoE^{-/-} acumulam altos níveis de colesterol em seu plasma (VASQUEZ et al., 2012).

Em nosso trabalho, os altos valores de colesterol total e colesterol LDL encontrados nos camundongos apoE^{-/-} estão em consonância com outros estudos como Plump (1992) e Zhang (1992), os quais foram os primeiros a demonstrar os valores de referência de colesterol plasmático nesses animais (PLUMP et al., 1992; ZHANG et al., 1992). Da mesma forma, Nakashima (1994) e Reddick (1994), demonstraram que os camundongos apoE^{-/-}, além de apresentarem altas taxas de colesterol plasmático, desenvolvem aterosclerose espontaneamente, sendo possível observar a presença de células espumosas a partir dos 2 meses de idade (NAKASHIMA et al., 1994; REDDICK et al., 1994).

Em outro estudo, Buzzelo et al., (2003), demonstrou que camundongos apoE^{-/-}, com 8 semanas de idade, apresentavam valores de colesterol total plasmático aumentado em cerca de 8 vezes. No entanto, não observou diferença estatística significativa nos níveis de triglicérides plasmáticos se comparados com camundongos C57 (BUZELLO, 2003). Fazendo uma analogia ao estudo de Buzzelo, os valores de colesterol total encontrados em nosso estudo, estavam aumentados em aproximadamente 4 vezes e colesterol LDL em aproximadamente 2 vezes no plasma de animais apoE^{-/-} com 8 semanas de idade. No entanto, como observado no estudo de Buzzelo et al., (2003), não observamos diferença significativa nos níveis de triglicérides plasmáticos de animais apoE^{-/-}, comparados com camundongos C57.

O aumento nos níveis de colesterol em plasma de animais apoE^{-/-} leva ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas, com consequente aumento na produção de ROS. Diversos estudos mostram que o estresse oxidativo é uma característica chave na aterogênese, pois as ROS estão envolvidas em todas as fases da doença, como na disfunção endotelial, na formação e desenvolvimento da placa aterosclerótica até sua ruptura (LEE et al., 2012). Segundo a teoria do estresse oxidativo, a aterosclerose é o resultado da modificação oxidativa de LDL na

parede arterial por ROS. Evidências sugerem que os fatores de risco para aterosclerose como a hipercolesterolemia, aumentam o risco de produção de ROS livre, não só a partir das células endoteliais, mas também a partir das células musculares lisas (VOGIATZI et al., 2009).

A hipercolesterolemia estimula a produção de $O_2^{\bullet-}$ nas células musculares lisas dos vasos, levando ao aumento da oxidação de LDL. O aumento na produção de ROS, mais especificamente H_2O_2 , leva a uma diminuição na biodisponibilidade de NO, levando a vasoconstrição, agregação de plaquetas e adesão de neutrófilos ao endotélio, favorecendo desse modo ainda mais o desenvolvimento e progresso da aterosclerose (VOGIATZI et al., 2009).

Além disso, sabe-se que os estados hiperlipidêmicos estão associados com propriedades físicas alteradas das membranas celulares, o que pode facilitar o escape de radicais livres a partir da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial ou a ativação da NADPH-oxidase (LUDWIG et al., 1982; ENGELMANN et al., 1992; YANG et al., 2008). A NADPH-oxidase é uma família de proteínas que transferem elétrons através de membranas biológicas. Em geral, o aceptor de elétrons é o oxigênio e o produto da reação de transferência de elétrons é o ânion superóxido. Por conseguinte, a função biológica das enzimas de NADPH-oxidase é a geração de ROS (VIOLI et al., 2009). Portanto, a hipercolesterolemia ativa a NADPH-oxidase, estimulando o aumento da produção de ROS.

Em um estado fisiológico normal, a concentração de ROS é mantida em níveis basais, através de sistemas antioxidantes tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GRX) (PHAM-HUY et al., 2008), não resultando em danos ao organismo. No entanto, durante a hipercolesterolemia e desenvolvimento da aterosclerose, a produção de ROS supera as defesas antioxidantes criando desse modo, um ambiente altamente oxidativo, levando a um círculo vicioso de produção de ROS induzida por ROS (TAVERNE et al., 2013).

O estresse oxidativo criado leva a oxidação de substratos biológicos como lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (BHATTACHARYYA et al., 2014). As proteínas são os principais alvos para o dano oxidativo *in vivo* devido à sua relativa abundância e a sua capacidade de sequestrar certas espécies reativas que são geradas durante o estresse oxidativo. As ROS, quando reagem com proteínas induzem modificações em aminoácidos, alterando sua estrutura e função (COLOMBO et al., 2015). O acúmulo de produtos de proteínas oxidadas aumenta durante o processo de envelhecimento e em algumas doenças, sendo denominadas como 'produtos avançados de oxidação proteica' (AOPP), as quais são geralmente carregadas pela albumina na circulação sanguínea durante o estresse oxidativo (COLOMBO et al., 2015).

Em nosso estudo, foi observado um aumento significativo na taxa de AOPP no grupo hipercolesterolêmico (apoE^{-/-}), revelando o aumento do estresse oxidativo plasmático nesses animais, causado pela hipercolesterolemia. Do mesmo modo, ocorre também aumento de estresse oxidativo em diversos órgãos de animais hipercolesterolêmicos, tais como coração, aorta, rim e pâncreas. Segundo Mai e Li, (2013), o aumento na produção de ROS nesses órgãos é causado possivelmente pela enzima NADPH oxidase (Nox) (MAI; LI, 2013). Portanto, durante a hipercolesterolemia e aterosclerose, as ROS estão aumentadas de forma considerável no plasma, podendo agir localmente e em locais e tecidos distantes as quais são produzidas, como coração, rim, pâncreas e na medula óssea.

O ambiente da medula óssea é caracterizado por possuir naturalmente baixos níveis de ROS, os quais são críticos para a manutenção do potencial de auto-renovação e diferenciação das células presentes em seu nicho. ROS em baixos níveis, funcionam como moléculas de sinalização mediando a proliferação, migração e diferenciação celular, além da expressão genética. Desse modo, os níveis de ROS em células-tronco têm uma clara correlação com as funções celulares e são regulados por um fino ajuste no equilíbrio entre sistemas de defesa antioxidantes e os sistemas de geração de ROS (MARALDI et al., 2015). No entanto, durante a hipercolesterolemia, ocorre um aumento na produção de ROS no plasma de camundongos apoE^{-/-}, bem como em outros tecidos, como na medula óssea.

As ROS, uma vez presentes na medula óssea, podem por difusão convencional, facilmente atravessar a membrana plasmática para o espaço intracelular. Segundo Chen et al., (2012), o H_2O_2 é uma molécula de meia vida longa, permitindo desse modo agir em locais distantes de seu sítio de geração, além de possuir a capacidade de atravessar camadas lipídicas facilmente, agindo no interior das células e gerando o radical $\bullet\text{OH}$ (CHEN; KEANEY, 2012).

Baixas concentrações de H_2O_2 , de origem exógena, atuam nas mitocôndrias, diminuindo a transferência de elétrons na cadeia mitocondrial, produzindo níveis moderados de ROS em CTMs. Por sua vez, níveis moderados de ROS aumentam a proliferação e migração celular, além de regulação de sua função secretora, através da secreção de várias citocinas e quimiocinas. Desse modo as CTMs estão aptas para migrar para os locais de reparo e ou dano tecidual e exercer suas funções (SART et al., 2015).

Por outro lado, em situações como hipercolesterolemia e aterosclerose, as ROS podem aumentar de forma exorbitante na medula óssea, prejudicando a homeostase das CTMs e as levando ao estresse oxidativo. O estresse oxidativo prejudica a adesão das células, além de promover danos ao DNA, encurtamento dos telômeros e parada do ciclo celular, levando desse modo a senescência e apoptose (SART et al., 2015).

Portanto, existe um equilíbrio entre a geração de ROS e síntese de antioxidantes, os quais regulam a homeostase das CTMs na medula óssea. Dessa forma os níveis basais de ROS são necessários para a ativação de várias vias celulares essenciais para a proliferação e sobrevivência das CTMs. Entretanto, a acumulação excessiva de ROS na medula óssea, leva a uma perda das funções celulares, além de induzir senescência e apoptose celular.

Em nosso estudo, verificamos a produção de ROS em CTMs da medula óssea, através da utilização de *probes* específicos, os quais após penetração no citoplasma se ligam a moléculas como $\text{O}_2\bullet$, H_2O_2 e NO, permitindo assim, a sua mensuração após análise em citômetro de fluxo. Foi observado, um aumento na produção de

$O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 em CTMs da medula óssea de camundongos hipercolesterolêmicos ($apoE^{-/-}$) se comparado com CTMs de camundongos normocolesterolêmicos (C57). Isso possivelmente se deve, pelo ambiente altamente oxidativo criado pela hipercolesterolemia e pelo aumento na produção de ROS no plasma desses animais durante as etapas iniciais do desenvolvimento da aterosclerose. Além disso, estes achados reforçam a hipótese que a hipercolesterolemia pode induzir estresse oxidativo em tecidos inespecíficos, como na medula óssea (TONINI et al., 2013).

Corroborando com nossos dados, Tonini et al., (2013), estudando a influência do envelhecimento e da hipercolesterolemia sobre células da medula óssea de camundongos $apoE^{-/-}$ e C57 jovens e idosos, mostrou que a hipercolesterolemia induz o aumento na produção de estresse oxidativo, danos no DNA e apoptose em células da medula óssea. O aumento de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 nessas células foi significativo mesmo em animais jovens (2 meses de idade), mostrando que a medula óssea é afetada pelo desequilíbrio oxidativo gerado desde as etapas iniciais do desenvolvimento da aterosclerose (TONINI et al., 2013). Desse modo, o aumento na produção de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 pode afetar diretamente o DNA celular, induzindo quebras simples e duplas, levando a ativação de vias que conduzem ao desenvolvimento de senescência e apoptose celular (GIORGIO et al., 2007).

A indução da senescência se inicia através dos danos ao DNA causado por ROS, desencadeando respostas de dano ao DNA (DDR) a qual envolve uma cascata de sinalização que conduz finalmente a ativação de p53/p21 e ou p16 e consequentemente a parada do ciclo celular (DEURSEN, VAN, 2014). O H_2O_2 exógeno se difunde facilmente para o interior celular induzindo uma ativação imediata de DDR. Desse modo, o H_2O_2 ativa uma sequência de transdução de sinal através das vias p53 / p21 e p38 / MK-2, as quais são necessárias e suficientes para estabelecer a parada irreversível do ciclo celular que é típica da senescência. Além disso, o p38 regula a produção intracelular e mitocondrial de ROS, pelo aumento de mitocôndrias funcionais, promovendo a estabilização da senescência através de um *feedback* que fornece ativação contínua de respostas de dano ao DNA (DDR) (BORODKINA et al., 2014)

Diversos estudos têm demonstrado os efeitos do estresse oxidativo sobre CTMs. Brandl et al., (2011), demonstrou que doses subletais de H_2O_2 reduziam as taxas de proliferação celular, induziam características morfológicas senescentes e aumento de β -galactosidase associada à senescência em CTMs (BRANDL et al., 2011). Burova et al., (2013), estudando o impacto de H_2O_2 sobre a viabilidade celular, indução da senescência prematura e apoptose em CTMs derivadas do endométrio, mostrou que as CTMs expostas às doses subletais de H_2O_2 , perdiam a capacidade proliferação celular e apresentavam mudanças em sua morfologia, passando a exibir um fenótipo senescente, incluindo hipertrofia das células e aumento da atividade β -galactosidase (BUROVA et al., 2013).

Do mesmo modo em nosso estudo, o aumento no estresse oxidativo nas CTMs da medula óssea de animais hipercolesterolêmicos, dada pelo aumento intracelular de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , levou a um aumento na porcentagem de células senescentes observada nesse grupo, o qual foi quantificado pelo aumento da atividade da enzima β -galactosidase nos lisossomos, após coloração específica.

O aumento significativo de ROS na medula óssea pode levar também a ativação de vias que conduzem a morte celular. Em nosso estudo, avaliamos a morte celular em CTMs da medula óssea através da anexina V, a qual é uma proteína que possui alta afinidade para a fosfatidilserina dos fosfolipídios de membrana. Em células normais a fosfatidilserina encontra-se situada na face interna da membrana plasmática. No entanto, quando a apoptose é iniciada ela é translocada para a face externa, permitindo a ligação da proteína anexina V, a qual pode ser conjugada com fluorocromos e analisada por citometria de fluxo (HINGORANI et al., 2011). Observamos em nosso estudo, um aumento na porcentagem de CTMs em apoptose no grupo hipercolesterolêmico em comparação com o grupo normocolesterolêmico, o qual foi causado possivelmente, pelo excesso de ROS presentes nas CTMs desses animais.

O aumento de ROS intra ou extracelular ativa a via intrínseca da apoptose. A via intrínseca inicia-se na mitocôndria, a qual sofre alteração na permeabilidade de sua membrana externa, resultando na dissipação do seu potencial de membrana. Isso

leva a parada da produção de ATP (*adenosine triphosphate*), assim como na libertação de uma série de proteínas para o citoplasma. A liberação de citocromo c para o citoplasma contribui para a ativação de caspases e aumento de ROS, levando a morte celular (FAVALORO et al., 2012).

Corroborando com nossos dados, Wei et al., (2010), demonstrou que ROS, de fontes exógenas, induzem apoptose em CTMs através da ativação precoce e transiente de p38 MAPK levando a via de morte mitocondrial e do retículo endoplasmático, por meio de caspase-3 e caspase-12 (WEI et al., 2010). Portanto o aumento de ROS na medula óssea causado pela hipercolesterolemia ativa vias que conduzem a senescência e morte celular das CTMs, contribuindo desse modo para um prejuízo na funcionalidade dessas células.

Do mesmo modo, o aumento de ROS leva a alterações estruturais em CTMs. Em nosso estudo, a influência da hipercolesterolemia sobre a morfologia das CTMs derivadas da medula óssea foi avaliada através de citometria de fluxo, microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão.

No citômetro de fluxo, as células são analisadas de acordo com suas propriedades físicas e químicas como tamanho e complexidade interna ou granulosidade. Desse modo, foi possível observar que as CTMs de animais hipercolesterolêmicos apresentam um aumento em seu tamanho celular quando comparadas as CTMs de animais normocolesterolêmicos. Do mesmo modo, a análise morfológica e morfométrica das CTMs em cultura, comprovaram esses resultados e além disso, mostraram que os núcleos celulares também estavam aumentados no grupo hipercolesterolêmico.

Outro dado importante obtido foi a mudança morfológica das CTMs em cultura. Diversos estudos demonstram que CTMs derivadas da medula óssea exibem uma morfologia do tipo fusiforme em cultura (fibroblast-like morphology) (PROCKOP, 1997; WATT et al., 2013)(PASQUINELLI et al., 2007; KARAÖZ et al., 2011). No entanto, as CTMs da medula óssea de camundongos hipercolesterolêmicos apresentam variações em sua morfologia passando a exibir células largas,

achatadas e com vacuolização citoplasmática. Essas características se devem, principalmente, as alterações morfológicas apresentadas por células em estado de parada do ciclo celular e ao desenvolvimento da senescência. Corroborando com nossos dados, diversos estudos tem demonstrado que células sob estresse oxidativo, passam a exibir um fenótipo senescente, com alterações significativas em sua morfologia, passando a se tornar alargadas, achatadas, com núcleos alargados e ou múltiplos e acúmulo de inclusões citoplasmáticas granulares (CHEN et al., 2007; KUILMAN et al., 2010; BRANDL et al., 2011; BUROVA et al., 2013; BORODKINA et al., 2014). O aumento no tamanho celular é por vezes tão significativo que algumas células podem apresentar o dobro do tamanho de uma célula normal (KUILMAN et al., 2010; RODIER; CAMPISI, 2011; BECKER; HAFERKAMP, 2013).

Através da análise ultraestrutural das CTMs, foi possível observar mais claramente as mudanças estruturais ocasionados pela hipercolesterolemia em CTMs de camundongos apoE^{-/-}. Primeiramente, as CTMs utilizadas em nosso estudo, são células em quinta passagem em cultura, sendo desse modo uma população em um relativo estado de diferenciação (RAIMONDO et al., 2006). Isso explica as principais características ultraestruturais encontradas em CTMs em nosso estudo, como elevado tamanho celular, elevada relação núcleo-citoplasma, presença elevada de pseudópodes ao redor da célula e organelas proeminentes em seu citoplasma (principalmente retículo endoplasmático, mitocôndrias e complexo de Golgi).

Nossos dados estão de acordo ainda com outros estudos que avaliaram a ultraestrutura de CTMs derivadas da medula óssea de humanos (PASQUINELLI et al., 2007; KARAÖZ et al., 2011), ratos (KARAOZ et al., 2009; MANTOVANI et al., 2012) e camundongos (RAIMONDO et al., 2006). Esses estudos demonstraram que CTMs possuem um citoplasma rico em organelas, especialmente mitocôndrias, além de aparelho de Golgi e retículo endoplasmático rugoso proeminente. Além disso, que essas células possuem muitos pequenos pseudópodes ao redor de toda a célula, o que pode ajudar a explicar a capacidade de migração desse tipo celular após implante no hospedeiro (RAIMONDO et al., 2006).

Apesar das uniformidades encontradas, verificamos que CTMs derivadas da medula óssea de animais hipercolesterolêmicos apresentam variações em sua morfologia, principalmente ao nível mitocondrial, quando comparadas à CTMs de animais normocolesterolêmicos. As CTMs de camundongos C57 apresentam mitocôndrias com forma geralmente alongada e cristas evidentes. De outro modo, as CTMs de camundongos apoE^{-/-} apresentam mitocôndrias com sinais claros de degeneração, possuindo evidentes alterações em sua morfologia, como a presença de mitocôndrias arredondadas, com cristas menos pronunciadas e rompimento de membranas externa e interna.

As alterações mitocondrias em CTMs de camundongos hipercolesterolêmicos se devem principalmente ao aumento do estresse oxidativo em CTMs da medula óssea, causada pela hipercolesterolemia, possibilitando o aumento da senescência e apoptose observado nessas células em nosso estudo. Como dito anteriormente, o estresse oxidativo leva a apoptose em CTMs através da ativação da via de morte mitocondrial e do retículo endoplasmático (WEI et al., 2010). Desse modo, as alterações mitocondrias causadas pelo estresse oxidativo na medula óssea levam a alterações estruturais nas mitocôndrias, tais como a remodelação de cristas, as quais estão envolvidos na iniciação da morte das células e são sinal inicial de senescência (ULIVIERI, 2010; MANTOVANI et al., 2012). Do mesmo modo a fragmentação das mitocôndrias tem mostrado desempenhar um papel fundamental na progressão da morte celular, através da liberação de proteínas mitocondriais para o citoplasma (tais como o citocromo c), as quais ativam as vias de morte celular por apoptose nas células (CHEUNG et al., 2007; MANTOVANI et al., 2012).

Portanto, a hipercolesterolemia aumenta diretamente os níveis citoplasmáticos de ROS em células da medula óssea, incluindo as CTMs, levando desse modo à ativação de vias que culminam no desenvolvimento de senescência e apoptose dessas células, o qual foi demonstrado nesse estudo. Consequentemente, as CTMs passam a exibir alterações em sua morfologia, principalmente com aumento em seu tamanho e área nuclear e celular, além de alterações mitocondriais típicas de estresse por ROS.

7 CONCLUSÃO

Neste estudo, avaliamos a influência da hipercolesterolemia sobre células-tronco mesenquimais provenientes da medula óssea. Observou-se que a hipercolesterolemia promove aumento na produção de espécies reativas de oxigênio em plasma e em células-tronco mesenquimais da medula óssea, a qual permanece mesmo depois de repetidas passagens em cultura. Consequentemente, houve um aumento na porcentagem de células senescentes e apoptóticas, bem como aumento no tamanho e área celular e nuclear, além de alterações morfológicas em cultura e ao nível mitocondrial nessas células. Desse modo, a hipercolesterolemia influencia a funcionalidade de células-tronco mesenquimais da medula óssea, podendo afetar a eficácia no uso dessas células para tratamento, cura e ou prevenção de doenças.

8 REFERÊNCIAS

1. ALLSOPP, R. C.; CHESHER, S.; WEISSMAN, I. L. Telomere shortening accompanies increased cell cycle activity during serial transplantation of hematopoietic stem cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 193, n. 8, p. 917–24, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11304552>>. .
2. ATASHI, F.; MODARRESSI, A.; PEPPER, M. S. The Role of Reactive Oxygen Species in Mesenchymal Stem Cell Adipogenic and Osteogenic Differentiation: A Review. **Stem Cells and Development**, v. 24, n. 10, p. 1150–1163, 2015. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2014.0484>>. .
3. BALABAN, R. S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, Oxidants, and Aging. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 483–495, 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867405001091>>.
4. BECKER, T.; HAFERKAMP, S. Molecular Mechanisms of Cellular Senescence. **Senescence and Senescence-Related Disorders**. v. 6, p.35, 2013. InTech. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359634908713090>>.
5. BEDARD, K.; KRAUSE, K.-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 245–313, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237347>>.
6. BHATTACHARYA, S. Reactive Oxygen Species and Cellular Defense System. **Free Radicals in Human Health and Disease**. v. 20, p.17–29, 2015. New Delhi: Springer India. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00006205-199507000-00003>>.
7. BHATTACHARYYA, A.; CHATTOPADHYAY, R.; MITRA, S.; CROWE, S. E. Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 2, p. 329–354, 2014. Disponível em: <<http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00040.2012>>. .
8. BORODKINA, A.; SHATROVA, A.; ABUSHIK, P.; NIKOLSKY, N.; BUROVA, E. Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. **Aging**, v. 6, n. 6, p. 481–95, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24934860>>. .
9. BOXALL, S. A; JONES, E. Markers for Characterization of Bone Marrow Multipotential Stromal Cells. **Stem Cells International**, v. 2012, p. 1–12, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3361338&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

10. BRANDL, A.; MEYER, M.; BECHMANN, V.; NERLICH, M.; ANGELE, P. Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells. **Experimental Cell Research**, v. 317, n. 11, p. 1541–1547, 2011. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.02.015>>.
11. BUROVA, E.; BORODKINA, A.; SHATROVA, A.; NIKOLSKY, N. Sublethal Oxidative Stress Induces the Premature Senescence of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Endometrium. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 1–12, 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/omcl/2013/474931/>>.
12. BUZELLO, M. The Apolipoprotein E Knockout Mouse: A Model Documenting Accelerated Atherogenesis In Uremia. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 2, p. 311–316, 2003. Disponível em: <<http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1097/01.ASN.0000045048.71975.FC>>.
13. CAN, A. A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. **Turkish Journal of Hematology**, v. 25, n. 2, p. 57–59, 2008. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-48649087453&partnerID=40&md5=d00ce53253367ba507f9247450405bdd>>. .
14. CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, n. 5, p. 641–650, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1870029>>. .
15. CHEN, J.-H.; HALES, C. N.; OZANNE, S. E. DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 22, p. 7417–7428, 2007. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkm681>>. .
16. CHEN, K.; KEANEY, J. F. Evolving Concepts of Oxidative Stress and Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Disease. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 14, n. 5, p. 476–483, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11883-012-0266-8>>. .
17. CHEUNG, E. C. C.; MCBRIDE, H. M.; SLACK, R. S. Mitochondrial dynamics in the regulation of neuronal cell death. **Apoptosis**, v. 12, n. 5, p. 979–992, 2007.
18. CHINETTI-GBAGUIDI, G.; COLIN, S.; STAELS, B. Macrophage subsets in atherosclerosis. **Nature Reviews Cardiology**, v. 12, n. 1, p. 10–17, 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrcardio.2014.173>>. .
19. CHIPUK, J. E.; GREEN, D. R. Dissecting p53-dependent apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, n. 6, p. 994–1002, 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.cdd.4401908>>. .
20. COLEMAN, R.; HAYEK, T.; KEIDAR, S.; AVIRAM, M. A mouse model for human atherosclerosis: Long-term histopathological study of lesion development in the aortic arch of apolipoprotein E-deficient (E⁰) mice. **Acta Histochem**, v. 108, p. 415–424, 2006. Disponível em: <<http://ac.els-cdn.com/S0065128106000870/1-s2.0->>

S0065128106000870-main.pdf?_tid=982ac33c-edb4-11e4-9921-00000aacb361&acdnt=1430232243_e4abf243cf095a5f5b20be1c70701bd4>. .

21. COLOMBO, G.; CLERICI, M.; GIUSTARINI, D.; et al. A central role for intermolecular dityrosine cross-linking of fibrinogen in high molecular weight advanced oxidation protein product (AOPP) formation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1850, n. 1, p. 1–12, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.09.024>>. .
22. DEURSEN, J. M. VAN. The role of senescent cells in ageing. **Nature**, v. 509, n. 7501, p. 439–46, 2014a. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24848057>>. .
23. DEURSEN, J. M. VAN. The role of senescent cells in ageing. **Nature**, v. 509, n. 7501, p. 439–446, 2014b. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24848057>>. .
24. DÍEZ VILLANUEVA, P.; SANZ-RUIZ, R.; NÚÑEZ GARCÍA, A.; et al. Functional Multipotency of Stem Cells: What Do We Need from Them in the Heart? **Stem Cells International**, v. 2012, p. 1–12, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3433152&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .
25. DOMINICI, M.; BLANC, K. LE; MUELLER, I.; et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1465324906708817>>. .
26. EL-BADRI, N.; GHONEIM, M. A. Mesenchymal Stem Cell Therapy in Diabetes Mellitus: Progress and Challenges. **Journal of Nucleic Acids**, v. 2013, p. 1–7, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23762531>>. .
27. ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. , v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.
28. ENGELMANN, B.; STREICH, S.; SCHÖNTHIER, U. M.; RICHTER, W. O.; DUHM, J. Changes of membrane phospholipid composition of human erythrocytes in hyperlipidemias. I. Increased phosphatidylcholine and reduced sphingomyelin in patients with elevated levels of triacylglycerol-rich lipoproteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1165, n. 1, p. 32–37, 1992. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0005276092900724>>. .
29. ESLAMINEJAD, M. B.; NIKMAHZAR, A.; TAGHIYAR, L.; NADRI, S.; MASSUMI, M. Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. **Development, Growth and Differentiation**, v. 48, n. 6, p. 361–370, 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-169X.2006.00874.x>>. .
30. FAVALORO, B.; ALLOCATI, N.; GRAZIANO, V.; ILIO, C. DI; LAURENZI, V. DE. Role

- of apoptosis in disease. **Aging**, v. 4, n. 5, p. 330–49, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22683550>>. .
31. FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 1907–1916, 2005. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005>>. .
 32. FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O.; STRANDBERG, T. The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 10, n. 5, p. 274–283, 2013. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23478256>>. .
 33. GIORGIO, M.; TRINEI, M.; MIGLIACCIO, E.; PELICCI, P. G. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 9, p. 722–728, 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrm/journal/v8/n9/full/nrm2240.html>>. .
 34. GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 1, p. 37–43, 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000406003185>>. .
 35. HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress: Figure 1. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 5, p. 1147–1150, 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/anie.198610581>>. .
 36. HANSSON, G. K. Innate and Adaptive Immunity in the Pathogenesis of Atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 91, n. 4, p. 281–291, 2002. Disponível em: <<http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.RES.0000029784.15893.10>>. .
 37. HAYFLICK, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**, v. 37, n. 3, p. 614–636, 1965. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014482765902119>>. .
 38. HINGORANI, R.; DENG, J.; ELIA, J.; MCINTYRE, C.; MITTAR, D. Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerse™ System. **BD Biosciences**, v. August, n. August, p. 1–12, 2011.
 39. HOLMSTRÖM, K. M.; FINKEL, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 411–421, 2014. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm3801>>. .
 40. INSTITUTO JONES DOS SANTOS NEVES. Síntese dos indicadores sociais do Espírito Santo em 2013. Disponível em: <<http://www.ijsn.es.gov.br/artigos/4298-sintese-dos-indicadores-sociais-do-espírito-santo-2015>>. .

41. JAMES, A. W. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica*, v. 2013, p. 1–17, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3874981&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
42. JAWIEN, J. The role of an experimental model of atherosclerosis: apoE-knockout mice in developing new drugs against atherogenesis. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 13, n. 13, p. 2435–9, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22280417>>. .
43. JIN, H.; BAE, Y.; KIM, M.; et al. Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Blood as Sources of Cell Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 9, p. 17986–18001, 2013. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/14/9/17986/>>. .
44. KARAOZ, E.; AKSOY, A.; AYHAN, S.; et al. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: Ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 132, n. 5, p. 533–546, 2009.
45. KARAÖZ, E.; OKÇU, A.; GACAR, G.; et al. A comprehensive characterization study of human bone marrow mscs with an emphasis on molecular and ultrastructural properties. **Journal of Cellular Physiology**, v. 226, n. 5, p. 1367–1382, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20945392>>. Acesso em: 17/7/2014.
46. KOLOVOU, G.; ANAGNOSTOPOULOU, K.; MIKHAILIDIS, D. P.; COKKINOS, D. V. Apolipoprotein E Knockout Models. , p. 338–351, 2008.
47. KUILMAN, T.; MICHALOGLOU, C.; MOOI, W. J.; PEEPER, D. S. The essence of senescence. **Genes & Development**, v. 24, n. 22, p. 2463–2479, 2010. Disponível em: <<http://genesdev.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gad.1971610>>. .
48. LEE, M. W.; RYU, S.; KIM, D. S.; et al. Strategies to improve the immunosuppressive properties of human mesenchymal stem cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, n. 1, p. 179, 2015. Stem Cell Research & Therapy. Disponível em: <<http://stemcellres.com/content/6/1/179>>. .
49. LEE, M. Y. K.; LI, H.; XIAO, Y.; et al. Chronic administration of BMS309403 improves endothelial function in apolipoprotein E-deficient mice and in cultured human endothelial cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 7, p. 1564–1576, 2011.
50. LEE, R. H.; PULIN, A. A.; SEO, M. J.; et al. Intravenous hMSCs Improve Myocardial Infarction in Mice because Cells Embolized in Lung Are Activated to Secrete the Anti-inflammatory Protein TSG-6. **Cell Stem Cell**, v. 5, n. 1, p. 54–63, 2009. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.003>>. .

51. LEE, R.; MARGARITIS, M.; M. CHANNON, K.; ANTONIADES, C. Evaluating Oxidative Stress in Human Cardiovascular Disease: Methodological Aspects and Considerations. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 16, p. 2504–2520, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3412204&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .
52. LEMISCHKA, I. R. Stem cell biology: A view toward the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1044, p. 132–138, 2005.
53. LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, G. K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 317–25, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21593864>>. .
54. LIN, H.-T.; OTSU, M.; NAKAUCHI, H. Stem cell therapy: an exercise in patience and prudence. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1609, p. 20110334–20110334, 2012. Disponível em: <<http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2011.0334>>. .
55. LOS ANGELES, A. DE; FERRARI, F.; XI, R.; et al. Hallmarks of pluripotency. **Nature**, v. 525, n. 7570, p. 469–478, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26399828>>. .
56. LUDWIG, P. W.; HUNNINGHAKE, D.; HOIDAL, J. INCREASED LEUCOCYTE OXIDATIVE METABOLISM IN HYPERLIPOPROTEINAEMIA. **The Lancet**, v. 320, n. 8294, p. 348–350, 1982. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673682905463>>. .
57. M.E. BOROUJENI, P. GOWDA, J. JOHNSON, J. R. AND S. S. The Proliferation and Differentiation Capacity of Bone Marrow Derived- Human Mesenchymal Stem Cells in Early and Late Doubling. Disponível em: <<http://www.scialert.net/abstract/?doi=ajb.2012.27.36>>. .
58. MAI, A.; LI, J. M. CHARACTERISATION OF ROS PRODUCTION IN DIFFERENT ORGANS OF MICE DEFICIENT OF NOX2, APOE, AND BOTH NOX2 AND APOE. **Heart**, v. 99, n. Suppl 2, p. A104–A104, 2013. Disponível em: <<http://heart.bmj.com/cgi/doi/10.1136/heartjnl-2013-304019.184>>. .
59. MANTOVANI, C.; RAIMONDO, S.; HANEEF, M. S.; et al. Morphological, molecular and functional differences of adult bone marrow- and adipose-derived stem cells isolated from rats of different ages. **Experimental Cell Research**, v. 318, n. 16, p. 2034–2048, 2012. Elsevier. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22659169>>. Acesso em: 17/7/2014.
60. MARALDI, T.; ANGELONI, C.; GIANNONI, E.; SELL, C. Reactive Oxygen Species in Stem Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1–2, 2015. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/omcl/2015/159080/>>. .

61. MEYRELLES, S. S.; PEOTTA, V. A.; PEREIRA, T. M.; VASQUEZ, E. C. Endothelial Dysfunction in the Apolipoprotein E-deficient Mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n. 1, p. 211, 2011. BioMed Central Ltd. Disponível em: <<http://www.lipidworld.com/content/10/1/211>>.
62. Ministério da Saúde. **Estatísticas sobre mortes no Brasil em 2011**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2011/09/doencas-cardiovasculares-causam-quase-30-das-mortes-no-pais>>. Acesso em: 22 de dezembro de 2014.
63. MOORE, K. J.; SHEEDY, F. J.; FISHER, E. A. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 10, p. 709–21, 2013. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23995626>>. .
64. MORRELL, C. N. Reactive Oxygen Species: Finding the Right Balance. **Circulation Research**, v. 103, n. 6, p. 571–572, 2008. Disponível em: <<http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCRESAHA.108.184325>>. .
65. MORRISON, S. J.; SHAH, N. M.; ANDERSON, D. J. Regulatory Mechanisms in Stem Cell Biology. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 287–298, 1997. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286740081867X>>. .
66. Organização Mundial de Saúde. **Estatísticas sobre saúde Mundial de 2012**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>>. Acesso em: 22 de dezembro de 2014.
67. NAKASHIMA, Y.; PLUMP, A. S.; RAINES, E. W.; BRESLOW, J. L.; ROSS, R. the Arterial Tree. **Arteriosclerosis**, p. 133–140, 1994.
68. NOMBELA-ARRIETA, C.; RITZ, J.; SILBERSTEIN, L. E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 2, p. 126–131, 2011. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3049>>. .
69. PARK, K.-H.; PARK, W. J. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. **Journal of Korean Medical Science**, v. 30, n. 9, p. 1213, 2015. Disponível em: <<http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.3346/jkms.2015.30.9.1213>>. .
70. PASQUINELLI, G.; TAZZARI, P.; RICCI, F.; et al. Ultrastructural Characteristics of Human Mesenchymal Stromal (Stem) Cells Derived from Bone Marrow and Term Placenta. **Ultrastructural Pathology**, v. 31, n. 1, p. 23–31, 2007. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01913120601169477>>. .
71. PEISTER, A. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. **Blood**, v. 103, n. 5, p. 1662–1668, 2004. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2003-09-3070>>. .

72. PENDSE, A. A.; ARBONES-MAINAR, J. M.; JOHNSON, L. A.; ALTENBURG, M. K.; MAEDA, N. Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice: atherosclerosis, metabolic syndrome, and beyond. **The Journal of Lipid Research**, v. 50, n. Supplement, p. S178–S182, 2008. Disponível em: <<http://www.jlr.org/cgi/doi/10.1194/jlr.R800070-JLR200>>. .
73. PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International Journal of Biomedical Science**, v. 4, n. 2, p. 89–96, 2008.
74. PIEDRAHITA, J. A.; ZHANG, S. H.; HAGAMAN, J. R.; OLIVER, P. M.; MAEDA, N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. May, p. 4471–4475, 1992.
75. PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143–147, 1999.
76. PLUMP, A. S.; SMITH, J. D.; HAYEK, T.; et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell**, v. 71, n. 2, p. 343–53, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1423598>>. .
77. POLCHERT, D.; SOBINSKY, J.; DOUGLAS, G.; et al. IFN- γ activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 6, p. 1745–1755, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3021120&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .
78. PORTO, M. L.; LIMA, L. C.; PEREIRA, T. M.; et al. Mononuclear cell therapy attenuates atherosclerosis in apoE KO mice. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n. 1, p. 155, 2011. BioMed Central Ltd. Disponível em: <<http://www.lipidworld.com/content/10/1/155>>. .
79. POURROVA, J.; KOTTOVA, M.; VOPRSALOVA, M.; POUR, M. Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. **Acta Physiologica**, v. 198, n. 1, p. 15–35, 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-1716.2009.02039.x>>. .
80. PROCKOP, D. J. Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 71–74, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.276.5309.71>>. .
81. RAIMONDO, S.; PENNA, C.; PAGLIARO, P.; GEUNA, S. Morphological characterization of GFP stably transfected adult mesenchymal bone marrow stem cells. **Journal of Anatomy**, v. 208, n. 1, p. 3–12, 2006. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2100180&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

82. RAY, P. D.; HUANG, B.-W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 5, p. 981–990, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>>. .
83. REDDICK, R. L.; ZHANG, S. H.; MAEDA, N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression [published erratum appears in *Arterioscler Thromb* 1994 May;14(5):839]. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 14, n. 1, p. 141–147, 1994. Disponível em: <<http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.ATV.14.1.141>>. .
84. RENEHAN, A. G. What is apoptosis, and why is it important? **BMJ**, v. 322, n. 7301, p. 1536–1538, 2001. Disponível em: <<http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.322.7301.1536>>. .
85. RODDY, G. W.; OH, J. Y.; LEE, R. H.; et al. Action at a Distance: Systemically Administered Adult Stem/Progenitor Cells (MSCs) Reduce Inflammatory Damage to the Cornea Without Engraftment and Primarily by Secretion of TNF- α Stimulated Gene/Protein 6. **STEM CELLS**, v. 29, n. 10, p. 1572–1579, 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/stem.708>>. .
86. RODIER, F.; CAMPISI, J. Four faces of cellular senescence. **The Journal of Cell Biology**, v. 192, n. 4, p. 547–556, 2011. Disponível em: <<http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.201009094>>. .
87. ROSS, R. Rous-Whipple Award Lecture. Atherosclerosis: a defense mechanism gone awry. **The American journal of pathology**, v. 143, n. 4, p. 987–1002, 1993.
88. SART, S.; SONG, L.; LI, Y. Controlling Redox Status for Stem Cell Survival, Expansion, and Differentiation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1–14, 2015. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/omcl/2015/105135/>>. .
89. SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, n. 2, p. 291–295, 1997. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>>. .
90. SOLEIMANI, M.; NADRI, S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 102–106, 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2008.221>>. .
91. STAPLETON, P. A.; GOODWILL, A. G.; JAMES, M. E.; FRISBEE, J. C. Altered mechanisms of endothelium-dependent dilation in skeletal muscle arterioles with genetic hypercholesterolemia. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, n. 3, p. R1110–R1119, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17626122>>. .

92. TAVERNE, Y. J. H. J.; BOGERS, A. J. J. C.; DUNCKER, D. J.; MERKUS, D. Reactive Oxygen Species and the Cardiovascular System. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 1–15, 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/omcl/2013/862423/>>. .
93. TONINI, C.; CAMPAGNARO, B.; LOURO, L.; et al. Effects of Aging and Hypercholesterolemia on Oxidative Stress and DNA Damage in Bone Marrow Mononuclear Cells in Apolipoprotein E-deficient Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 3325–3342, 2013. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/14/2/3325/>>. .
94. UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 9, p. 726–736, 2008.
95. ULIVIERI, C. Cell death: Insights into the ultrastructure of mitochondria. **Tissue and Cell**, v. 42, n. 6, p. 339–347, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tice.2010.10.004>>. .
96. VASQUEZ, E. C.; PEOTTA, V. A.; GAVA, A. L.; PEREIRA, T. M.; MEYRELLES, S. S. Cardiac and vascular phenotypes in the apolipoprotein E-deficient mouse. **Journal of Biomedical Science**, v. 19, n. 1, p. 22, 2012. BioMed Central Ltd. Disponível em: <<http://www.jbiomedsci.com/content/19/1/22>>. .
97. VIOLI, F.; BASILI, S.; NIGRO, C.; PIGNATELLI, P. Role of NADPH oxidase in atherosclerosis. **Future Cardiology**, v. 5, n. 1, p. 83–92, 2009. Disponível em: <<http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/14796678.5.1.83>>. .
98. VOGIATZI, G.; TOUSOULIS, D.; STEFANADIS, C. The role of oxidative stress in atherosclerosis. **Hellenic journal of cardiology: HJC = Hellēnikē kardiologikē epitheōrēsē**, v. 50, n. 5, p. 402–9, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19767282>>. .
99. WALKER, J. M.; VEMURI, M.; CHASE, L. L. G.; et al. **Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications**. Totowa, NJ: Humana Press, 2011.
100. WATT, S. M.; GULLO, F.; GARDE, M. VAN DER; et al. The angiogenic properties of mesenchymal stem/stromal cells and their therapeutic potential. **British Medical Bulletin**, v. 108, n. 1, p. 25–53, 2013.
101. WEI, H.; LI, Z.; HU, S.; CHEN, X.; CONG, X. Apoptosis of mesenchymal stem cells induced by hydrogen peroxide concerns both endoplasmic reticulum stress and mitochondrial death pathway through regulation of caspases, p38 and JNK. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 111, n. 4, p. 967–978, 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.22785>>. .

102. WEI, X.; YANG, X.; HAN, Z.; et al. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 6, p. 747–754, 2013. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/aps.2013.50>>. .
103. WITKO-SARSAT, V.; FRIEDLANDER, M.; CAPEILLÈRE-BLANDIN, C.; et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney international**, v. 49, n. 5, p. 1304–1313, 1996.
104. XAVIER H. T., IZAR M. C., FARIA NETO J. R., ASSAD M. H., ROCHA V. Z., SPOSITO A. C., FONSECA F. A., DOS SANTOS J. E., SANTOS R. D., BERTOLAMI M. C., FALUDI A. A., MARTINEZ T. L. R., DIAMENT J., GUIMARÃES A., FORTI N. A., MORIGUCHI E., CHAGAS A. C. P., CO, R. J. A. F. V DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, 2013.
105. YANG, R.-L.; SHI, Y.-H.; HAO, G.; LI, W.; LE, G.-W. Increasing Oxidative Stress with Progressive Hyperlipidemia in Human: Relation between Malondialdehyde and Atherogenic Index. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 43, n. 3, p. 154–158, 2008. Disponível em: <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jcbrn/43.154?from=CrossRef>>. .
106. ZHANG, S. H.; REDDICK, R. L.; PIEDRAHITA, J. A.; MAEDA, N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. **Science**, v. 258, n. 5081, p. 468–471, 1992.